

对氨基水杨酸钠对染锰大鼠基底核 GABA_AR 及 GAT-1 表达的影响

欧超燕^{1a, 2}, 罗海兰^{1a}, 姜岳明^{1a}, 王禅^{1a}, 蒙浩洋^{1a}, 姜力^{1a}, 区仕燕^{1a}, 邓祥发^{1b}

摘要: [目的] 探讨对氨基水杨酸钠(PAS-Na)对短期或亚慢性染锰大鼠基底核 γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)A受体(GABA_Areceptor, GABA_AR)及GABA转运载体-1(GABA transporter-1, GAT-1)表达的影响。[方法] 将短期实验大鼠分为染锰组、PAS低(L-)、高(H-)剂量治疗组和对照组,观察期为7、10周;将亚慢性实验大鼠分为对照组、染锰组、PAS预防组 and PAS低(L-)、中(M-)、高(H-)剂量治疗组,观察期为4、8、12、18周。用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑基底核GABA_AR及GAT-1表达。[结果] 短期实验中,观察期7周,染锰组GABA_AR蛋白表达较对照组高($P<0.05$);观察期10周,染锰组GABA_AR和GAT-1 mRNA表达较对照组低, L-PAS、H-PAS治疗组基底核GAT-1 mRNA表达较染锰组高($P<0.05$)。亚慢性实验中,观察期4周,染锰组GABA_AR mRNA表达较对照组高($P<0.05$);观察期8周,染锰组GABA_AR mRNA表达较对照组低,预防组GABA_AR mRNA表达较染锰组高($P<0.05$)。观察期12周,染锰组GABA_AR蛋白表达较对照组高,预防组GABA_AR蛋白表达较染锰组低($P<0.05$)。观察期18周,染锰组GABA_AR mRNA表达较对照组低, GAT-1 mRNA表达较对照组高, H-PAS治疗组GAT-1 mRNA表达较染锰组低($P<0.05$)。[结论] 短期或亚慢性锰暴露对大鼠基底核GABA_AR和GAT-1 mRNA表达都有明显的毒性影响, PAS-Na对亚慢性锰暴露致GABA_AR mRNA或蛋白表达改变有预防性干预作用,对锰致大鼠基底核GAT-1 mRNA表达改变有治疗性干预作用。

关键词: 对氨基水杨酸钠; 锰中毒; 基底核; γ -氨基丁酸A受体; γ -氨基丁酸转运载体; 实验治疗

Effect of PAS-Na on GABA_AR and GAT-1 Protein and mRNA Levels in Basal Ganglia of Manganese-Exposed Rats OU Chao-yan^{1a, 2}, LUO Hai-lan^{1a}, JIANG Yue-ming^{1a}, WANG Chan^{1a}, MENG Hao-yang^{1a}, JIANG Li^{1a}, OU Shi-yan^{1a}, DENG Xiang-fa^{1b} (1.^a Department of Toxicology, School of Public Health, ^b Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China). Address correspondence to JIANG Yue-ming, E-mail: ymjiang@163.com; DENG Xiang-fa, E-mail: dengxf@hotmai.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of sodium para-aminosalicylate (PAS-Na) on the expression of gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA_AR) and gamma-aminobutyric acid transporter (GAT-1) in short-term or subchronic manganese (Mn)-exposed rats. [Methods] In the short-term experiment, rats were divided into control, Mn-exposed, low-dose PAS-Na (L-PAS) and high-dose PAS-Na (H-PAS) groups, each subgroup of 10 rats were necropsied at the end of week 7 and 10. In the subchronic experiment, rats were divided into control, Mn-exposed, PAS-Na prevention (P-PAS), and L-PAS, M-PAS (middle-dose PAS-Na) and H-PAS groups, and were observed at week 4, 8, 12 and 18. The mRNA and protein expression of GABA_AR and GAT-1 in rat basal ganglia were examined by real-time fluorescence polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot (WB). [Results] In the short-term experiment, on observation week 7, GABA_AR protein expression was significantly increased in Mn-exposed group ($P<0.05$); on observation week 10, GABA_AR and GAT-1 mRNA expression were significantly decreased in Mn-exposed rats ($P<0.05$), and L-PAS and H-PAS treatment restored their GAT-1 mRNA expression ($P<0.05$). In the subchronic experiment, on observation week 4, GABA_AR mRNA expression was greatly increased in Mn-exposed rats ($P<0.05$); on observation week 8, GABA_AR mRNA expression was greatly decreased in Mn-exposed rats vs controls ($P<0.05$) and increased in P-PAS group vs Mn-exposed rats ($P<0.05$); however, on observation week 12, GABA_AR protein expression was greatly increased in Mn-exposed rats vs controls ($P<0.05$) and decreased in P-PAS vs Mn-exposed rats ($P<0.05$); on observation week 18, GABA_AR mRNA expression was

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072320, 30760210)

[作者简介] 欧超燕(1976—),女,博士生,讲师;研究方向:神经毒理学;E-mail: oak009@163.com

[通信作者] 姜岳明教授, E-mail: ymjiang@163.com; 邓祥发副教授, E-mail: dengxf@hotmai.com

[作者单位] 1. 广西医科大学 a. 公共卫生学院卫生毒理学教研室, b. 基础医学院人体解剖学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 桂林医学院公共卫生学院, 广西 桂林 541004

greatly decreased in Mn-exposed rats vs controls ($P < 0.05$), and GAT-1 mRNA expression was greatly increased in Mn-exposed rats vs controls ($P < 0.05$) and decreased in H-PAS vs Mn-exposed rats ($P < 0.05$). [Conclusion] Short-term and subchronic exposure of manganese exhibited obvious toxic effects in the expression of mRNA GABA_AR and GAT-1 in basal ganglia of rats. PAS-Na played a preventive intervention role in the GABA_AR mRNA or protein expression of subchronic Mn-exposed rats and a therapeutic intervention role in the GAT-1 mRNA expression.

Key Words: sodium para-aminosalicylate; manganese poisoning; basal ganglia; γ -aminobutyric acid A receptor; γ -aminobutyric acid transporter; experimental therapy

核磁共振波谱(MRS)检测显示,锰暴露男冶炼工组丘脑及其邻近基底核 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)-感兴趣区(VOI)GABA水平升高和额叶皮质N-乙酰天冬氨酸(NAA)水平降低,表明非锰最初靶脑区的神经元功能障碍^[1]。作者在前期研究中^[2]观察到短期染锰对大鼠基底核谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)和甘氨酸(Gly)含量的毒性作用明显,以对Gly的毒性影响出现较早,脱离锰暴露后其毒性影响仍然继续发展。GABA是脑的抑制性神经递质,由神经细胞末端突触前膜释放,与突触后部GABA受体(GABA receptor, GABA_AR)结合,抑制神经兴奋性,调节神经系统功能。GABA_AR是抑制性神经递质受体,介导GABA大部分的生理学功能。从突触清除GABA主要依靠GABA转运蛋白(GABA transporter, GAT),它是一种主要位于神经元及其胶质膜上的糖蛋白,主要清除突触的GABA,其中GAT-1是神经系统中最重要GABA转运蛋白,在GABA的代谢过程中发挥着重要作用。ANDERSON等研究显示,锰可引起多巴胺(dopamine, DA)和GABA的生物学改变。锰暴露会降低脑组织GABA水平和突触对³H-GABA的吸收,GABA载体及受体蛋白表达的改变可能使细胞外GABA含量增加。通过免疫印迹和实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)分析发现,锰暴露使大鼠黑质GAT-1蛋白质表达下降约50%,mRNA表达升高约4倍,尾状核mRNA表达降低,提示锰暴露通过改变载体和受体蛋白的表达,导致细胞外GABA浓度上升,可能是锰中毒神经病学特征的基础^[3]。在锰中毒治疗研究中,对氨基水杨酸钠(PAS-Na)在临床研究和实验观察中治疗锰中毒效果较好^[2,4-6],其机制尚未完全清楚。本研究旨在探讨PAS-Na对短期或亚慢性锰暴露致GABA_AR、GABA转运蛋白表达改变是否有干预作用,为阐明PAS-Na治疗锰中毒机制及其防治对策提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物及饲养条件

无特定病原体(SPF)级雄性SD大鼠,适应性喂养1周。大鼠和饲料由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物机构许可证号为SCXK桂2009-0002。动物饲养室温(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 10)%,12h光照/12h黑暗周期。

1.2 主要试剂

氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,优级纯,天津市光复精细化工研究所);PAS-Na(注射用粉剂,辽宁倍奇药业有限公司);Trizol-A+总RNA提取试剂、RNA逆转录试剂盒、RT-PCR试剂盒(均来自北京天根生化科技有限公司);荧光定量PCR反应板(美国Applied Biosystems公司);引物(上海Invitrogen公司

合成);实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司);GABA_AR(抗体批号为ab48341,英国Abcam公司);GAT-1(抗体批号为ab426,英国Abcam公司)。

1.3 动物分组、染锰及PAS-Na治疗

(1)40只大鼠,体重(153.9 ± 12.6)g,随机分为染锰组、PAS-Na(L-PAS、H-PAS)低、高剂量治疗组和对照组,共4组。观察期为7周(染锰4周+PAS治疗3周)、10周(染锰4周+PAS治疗6周),每期每组5只大鼠。染锰、PAS治疗组腹腔注射 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/kg,对照组腹腔注射等容量生理盐水,每日1次,每周5d,连续4周。4周后,PAS治疗组大鼠背部皮下注射PAS-Na100或200 mg/kg,其余组背部皮下注射等容量生理盐水,每日1次,连续3周或6周。(2)65只大鼠,体重(127.5 ± 6.7)g,随机分为对照组、染锰组、PAS-Na预防性干预(预防组)和PAS-Na(L-PAS、M-PAS、H-PAS)低、中、高剂量治疗组,观察期为4、8、12、18周,每期每组5只大鼠。染锰组、预防组、PAS治疗组腹腔注射 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/kg,对照组腹腔注射等容量生理盐水,每日1次,每周5d,连续4、8、12周,其中预防组在染锰的同时,每天背部皮下注射PAS-Na 200 mg/kg(每周3d),连续8、12周。然后,给L-PAS、M-PAS、H-PAS治疗组分别皮下注射PAS-Na 100、200、300 mg/kg,其余组背部皮下注射等容量生理盐水,每日1次,连续6周。

1.4 RT-PCR和Western blot检测

大鼠断头,冰上取脑,参照大鼠脑解剖定位图分离基底核,迅速放入液氮中,48h后移入 -80°C 冻存直至检测。

1.4.1 RT-PCR检测GABA_AR和GAT-1 mRNA表达 参照Trizol说明书,提取基底核总RNA,用紫外分光光度计测定RNA样品的浓度和纯度。取100 ng总RNA,参照天根cDNA逆转录试剂盒及RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录及PCR反应。引物序列:GABA_AR上游5'TCACCAAGAGAGGGGTATGCG 3',下游5'GGCTTGACTTCTTTTCGGGTCTTA 3';GAT-1上游5'CTCTCCCC TCTGGGCTATCC 3',下游5'GAATTCACGGCGATTGCG 3';GAPDH上游5'GTTCAACGGCACAGTCAAGG 3',下游5'CGCC AGTAGACTCCACGACA 3'。荧光PCR条件为:退火温度 60°C ,40个循环, 68°C 收集荧光。

mRNA相对表达量通过其Ct值来表示,其计算公式为: $\text{mRNA平均相对含量} = 2^{-\text{平均} \Delta \Delta \text{Ct}}$, $\Delta \Delta \text{Ct} = \Delta \text{Ct}_{\text{未知}} - \Delta \text{Ct}_{\text{参照}}$, $\Delta \text{Ct}_{\text{未知}} = \text{Ct}_{\text{目的基因(实验组)}} - \text{Ct}_{\text{内参基因(实验组)}}$, $\Delta \text{Ct}_{\text{参照}} = \text{Ct}_{\text{目的基因(参照基因组)}} - \text{Ct}_{\text{内参基因(参照基因组)}}$ 。

1.4.2 Western blot检测GABA_AR和GAT-1蛋白表达 考马斯亮蓝进行蛋白定量。取预染蛋白2 μL 和50 μg 蛋白上样电泳[12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶],电压140 V。

转印至醋酸纤维素 (NC) 膜 (200 mV, 2 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭 40 min, 加入 GABA_AR 一抗 (1:800) 或 GAT-1 一抗 (1:800) 或 GAPDH 一抗 (1:5000), 4℃ 摇床孵育过夜, 次日加入相应二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h, 增强化学发光法 (ECL) 显色, 结果经自动电泳凝胶成像分析系统仪采集, 测得灰度值。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, 多组间两两比较采用最小显著差数法 (LSD), 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PAS-Na 对染锰大鼠体重的影响

实验过程中, 各组大鼠无死亡现象。短期试验中, 染锰 1~4 周组大鼠体重增加比对照组少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。PAS-Na 治疗 3 周, 未见实验组间体重差异有统计学意义。PAS-Na 治疗第 4~5 周, L-PAS 组大鼠体重均比染锰组轻, H-PAS 组体重增加比 L-PAS 多, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。亚慢性实验中, 观察期为 1~3 周的染锰组大鼠体重增加比对照组大鼠少, 预防组大鼠体重增加比染锰组多, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。观察期为 8、10 周的染锰组大鼠体重比对照组大鼠轻 ($P<0.05$)。其余观察期, 未见实验组间体重增加差异有统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 PAS-Na 对染锰大鼠基底核 GABA_AR mRNA 及蛋白表达的影响

在短期实验中, 观察期 7 周, 染锰组 GABA_AR 蛋白表达比对照组高 ($P<0.05$)。观察期 10 周, 染锰组 GABA_AR mRNA 表达比对照组低 ($P<0.05$)。

在亚慢性实验中, 观察期 4 周, 染锰组 GABA_AR mRNA 表达比对照组高 ($P<0.05$)。观察期 8 周, 染锰组 GABA_AR mRNA 表达比对照组低, 预防组 GABA_AR mRNA 表达比染锰组高 ($P<0.05$)。观察期 12 周, 染锰组 GABA_AR 蛋白表达比对照组高, 预防组 GABA_AR 蛋白表达比染锰组低 ($P<0.05$)。观察期 18 周, 染锰组 GABA_AR mRNA 表达比对照组低 ($P<0.05$), 见表 1 和图 1。

表 1 PAS-Na 治疗对染锰大鼠基底核 GABA_AR mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

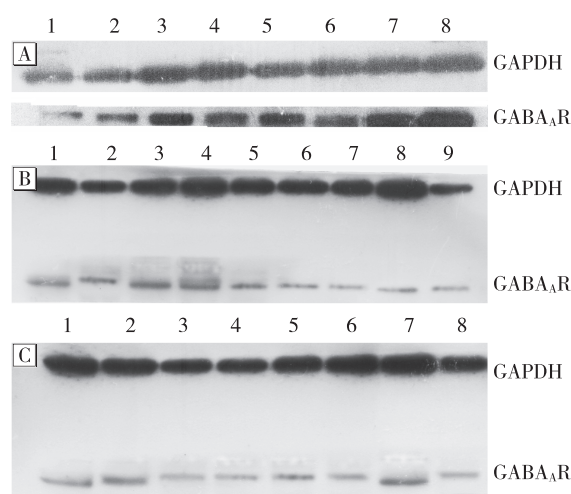
Table 1 Effects of PAS-Na on the GABA_AR mRNA and protein expression in Mn-exposed rats

组别 Group	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值) mRNA expression	蛋白表达 (灰度值) Protein expression
短期实验 (Short-term experiment)		
观察期 7 周 (Observation week 7)		
对照组 (Control)	1.000	0.597 ± 0.220
染锰组 (Mn-exposed)	1.314 ± 0.628	1.134 ± 0.281*
低-PAS 组 (L-PAS)	0.834 ± 0.173	1.228 ± 0.103
高-PAS 组 (H-PAS)	0.952 ± 0.379	1.266 ± 0.244
观察期 10 周 (Observation week 10)		
对照组 (Control)	1.000	0.639 ± 0.119
染锰组 (Mn-exposed)	0.615 ± 0.308*	0.605 ± 0.055
低-PAS 组 (L-PAS)	0.614 ± 0.325	0.775 ± 0.097
高-PAS 组 (H-PAS)	0.674 ± 0.386	0.639 ± 0.136

续表 1

组别 Group	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值) mRNA expression	蛋白表达 (灰度值) Protein expression
亚慢性实验 (Subchronic experiment)		
观察期 4 周 (Observation week 4)		
对照组 (Control)	1.000	0.276 ± 0.125
染锰组 (Mn-exposed)	2.391 ± 0.991*	0.293 ± 0.117
观察期 8 周 (Observation week 8)		
对照组 (Control)	1.000	0.248 ± 0.062
染锰组 (Mn-exposed)	0.355 ± 0.186*	0.388 ± 0.118
PAS 预防组 (PAS-P)	0.619 ± 0.302 [△]	0.333 ± 0.113
观察 12 周 (Observation week 12)		
对照组 (Control)	1.000	0.304 ± 0.074
染锰组 (Mn-exposed)	1.389 ± 1.003	0.563 ± 0.212*
PAS 预防组 (PAS-P)	1.149 ± 1.114	0.357 ± 0.121 [△]
观察期 18 周 (Observation week 18)		
对照组 (Control)	1.000	0.497 ± 0.276
染锰组 (Mn-exposed)	0.483 ± 0.156*	0.565 ± 0.216
低-PAS 组 (L-PAS)	0.460 ± 0.117	0.530 ± 0.293
中-PAS 组 (M-PAS)	0.620 ± 0.213	0.685 ± 0.178
高-PAS 组 (H-PAS)	0.676 ± 0.240	0.554 ± 0.271

[注]*: 与对照组比较 (Compared with the controls), $P<0.05$; [△]: 与染锰组比较 (Compared with the Mn-exposed group), $P<0.05$ 。



[注] A1~8 分别为: 观察期 7 周对照、染锰、L-PAS、H-PAS, 观察期 10 周对照、染锰、L-PAS、H-PAS; B1~9 分别为观察期 8 周预防、染锰 1、染锰 2、对照 1、对照 2, 观察期 4 周染锰 1、对照 1、对照 2、染锰 2; C1~8 分别为: 观察期 18 周 H-PAS、M-PAS、L-PAS、染锰、对照, 观察期 12 周预防、染锰、对照 (A1-8 represent the groups of control, Mn, L-PAS, H-PAS of observation week 7 and the groups of control, Mn, L-PAS, H-PAS of observation week 10, respectively. B1-9 represent the groups of PAS-P, Mn-1, Mn-2, control-1, control-2 of observation week 8 and the groups of Mn-1, control-1, control-2, Mn-2 of observation week 4, respectively. C1-8 represent the groups of H-PAS, M-PAS, L-PAS, Mn, control of observation week 18 weeks and the groups of PAS-P, Mn, control of observation week 12, respectively)。

图 1 GABA_AR 免疫印迹

Figure 1 GABA_AR by Western blot

2.3 PAS-Na 对染锰大鼠基底核 GAT-1 mRNA 及蛋白表达的影响

在短期实验中, 观察期 10 周, 染锰组基底核 GAT-1 mRNA 表达均值比对照组低, L-、H-PAS 治疗组基底核 GAT-1 mRNA 表达比染锰组高 ($P<0.05$)。

在亚慢性实验中, 观察期 18 周, 染锰组 GAT-1 mRNA 表达比对照组高, H-PAS 治疗组 GAT-1 mRNA 表达比染锰组低 ($P<0.05$), 见表 2 和图 2。

表 2 PAS-Na 治疗对染锰大鼠基底核 GAT-1 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of PAS-Na on the GAT-1 mRNA and protein expression in Mn-exposed rats

组别 Group	mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值) mRNA expression	蛋白表达(灰度值) Protein expression
短期实验(Short-term experiment)		
观察期 7 周(Observation week 7)		
对照组(Control)	1.000	1.436 $\pm$ 0.420
染锰组(Mn-exposed)	0.964 $\pm$ 0.258	1.325 $\pm$ 0.550
低-PAS 组(L-PAS)	0.904 $\pm$ 0.253	1.519 $\pm$ 0.132
高-PAS 组(H-PAS)	0.886 $\pm$ 0.276	1.242 $\pm$ 0.439
观察期 10 周(Observation week 10)		
对照组(Control)	1.000	1.191 $\pm$ 0.256
染锰组(Mn-exposed)	0.570 $\pm$ 0.316*	1.430 $\pm$ 0.139
低-PAS 组(L-PAS)	0.956 $\pm$ 0.273 Δ	1.513 $\pm$ 0.379
高-PAS 组(H-PAS)	0.963 $\pm$ 0.294 Δ	1.135 $\pm$ 0.464
亚慢性实验(Subchronic experiment)		
观察期 4 周(Observation week 4)		
对照组(Control)	1.000	2.366 $\pm$ 1.104
染锰组(Mn-exposed)	1.023 $\pm$ 1.509	1.737 $\pm$ 0.544
观察期 8 周(Observation week 8)		
对照组(Control)	1.000	1.605 $\pm$ 0.449
染锰组(Mn-exposed)	1.177 $\pm$ 1.462	1.444 $\pm$ 0.514
PAS 预防组(PAS-P)	0.842 $\pm$ 0.527	1.772 $\pm$ 0.616
观察 12 周(Observation week 12)		
对照组(Control)	1.000	2.886 $\pm$ 2.295
染锰组(Mn-exposed)	1.511 $\pm$ 1.656	2.347 $\pm$ 0.910
PAS 预防组(PAS-P)	1.544 $\pm$ 0.949	2.907 $\pm$ 1.365

3 讨论

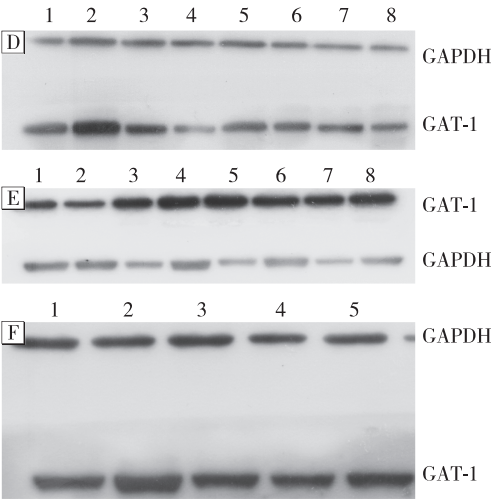
短期或亚慢性染锰使大鼠体重增加明显减少, 与前期研究^[2]报道锰对大鼠基底核 Glu、Gln 和 Gly 的毒作用相一致, 说明本研究所用的染锰剂量及时间达到中毒水平。

锰致兴奋性谷氨酸能和抑制性 GABA 能神经递质紊乱可能是锰神经毒性机制之一^[7]。经饮水锰暴露可引起大鼠纹状体细胞外 GABA 浓度增高, GABA 受体和转运蛋白表达发生改变^[8]。哺乳动物 GABA_AR 是分布于细胞膜上的跨膜糖蛋白, 主要由 α 、 β 和 γ 亚基组成, 是脑内最普遍的抑制性神经递质受体。人类焦虑症、抑郁症、记忆障碍等许多神经精神性疾病的发生发展与 GABA_AR 有关, 尤其是 α 亚基。本研究显示, 染锰 4 周大鼠基底核 GABA_AR mRNA 表达明显增高, 停止染锰 3 周大鼠基底核 GABA_AR mRNA 表达恢复接近对照组水平, 而 GABA_AR 蛋白表达明显增高, 停止染锰 6 周大鼠基底核

续表 2

组别 Group	mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值) mRNA expression	蛋白表达(灰度值) Protein expression
观察期 18 周(Observation week 18)		
对照组(Control)	1.000	1.532 $\pm$ 0.350
染锰组(Mn-exposed)	6.594 $\pm$ 4.716*	2.138 $\pm$ 0.907
低-PAS 组(L-PAS)	5.836 $\pm$ 0.716	1.714 $\pm$ 0.509
中-PAS 组(M-PAS)	4.945 $\pm$ 2.944	1.889 $\pm$ 0.792
高-PAS 组(H-PAS)	2.295 $\pm$ 1.804 Δ	1.827 $\pm$ 0.940

[注]*: 与对照组比较(Compared with the controls), $P<0.05$; Δ : 与染锰组比较(Compared with the Mn-exposed group), $P<0.05$ 。



[注] D1~8 分别为: 观察期 7 周对照、染锰、L-PAS、H-PAS, 观察期 10 周对照、染锰、L-PAS、H-PAS; E1~8 分别为: 观察期 4 周对照、染锰, 观察期 8 周对照、染锰、预防, 观察期 12 周对照、染锰、预防; F1~5 分别为: 观察期 18 周 H-PAS、M-PAS、L-PAS、染锰、对照(D1-8 represent groups of control, Mn, L-PAS, H-PAS of observation week 7 and the groups of control, Mn, L-PAS, H-PAS of observation week 10, respectively. E1-8 represent the groups of control and Mn of observation week 4, the groups of Mn, control and PAS-P of observation week 8 weeks, and the groups of Mn, control and PAS-P of observation week 12 weeks, respectively. F1-5 represent the groups of H-PAS, M-PAS, L-PAS, Mn, control of observation week 18, respectively.)。

图 2 GAT-1 免疫印迹

Figure 2 GAT-1 by Western blot

GABA_AR mRNA 表达明显降低, 提示短期染锰可引起大鼠基底核 GABA_AR mRNA 表达异常, 脱离暴露仍然出现进行性的神经毒性反应, 尤其是对 GABA_AR mRNA 表达的影响较为明显。在亚慢性实验的动态观察中, 染锰 4、8 和 12 周大鼠基底核 GABA_AR mRNA 表达出现升高-降低-接近对照组水平, 停止染锰 6 周后其基底核 GABA_AR mRNA 表达明显下降, 与亚急性毒性损害的趋势相似。锰的神经毒性进行性损害与锰中毒病人的临床表现相吻合, 锰主要在脑蓄积, 自然排出很慢, 锰中毒病人尽管已脱离暴露环境, 其病情仍然可以发展加重^[4]。较早的研究显示, 锰对大鼠纹状体多巴胺(DA)能系统的毒性作用有双相现象, 长期经饮水染锰($MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1 mg/mL, 360 d)的大鼠纹状体 DA、NE(去甲肾上腺素)含量出现“升高-对照组水平-降低”的趋势。对此现象作者认为染锰早期锰可能促进神经递质合成代谢加快, 然后形成耐受性, 晚期则由于基底核

神经元变性受损所致^[9]。因此,推测染锰 4、8、12 周和停止染锰 6 周大鼠基底核 GABA_AR mRNA 表达出现“升高-降低-对照组水平-明显下降”的原因,可能是锰暴露使 GABA 能神经元出现“激活-轻度变性-耐受-严重变性或坏死”现象,此乃可部分解释锰中毒发生、发展不同时期的中枢 GABA 能神经元生化机制。

对氨基水杨酸(PAS)治疗 3 周,使亚急性染锰大鼠纹状体、脉络丛、脑脊液(CSF)、心、肝、睾丸、脾、胰腺和红细胞锰含量降低;治疗 6 周,使纹状体、海马、丘脑、运动神经皮质、脉络丛和红细胞锰含量降低^[6]。大鼠腹腔注射 MnCl₂ [MnCl₂ · 4H₂O 15 mg/(kg · d),每周 5 d] 4 周 +PAS-Na 治疗 6 周时,低、高剂量 PAS-Na 治疗组 Glu、Gln 和高剂量 PAS-Na 治疗组 Gly 含量比染锰组高,提示 PAS-Na 对锰的 Glu、Gln 和 Gly 毒性影响可能有拮抗作用^[2]。对牡蛎鳃给予 PAS 预处理可阻断锰神经毒性。牡蛎连续染锰 3 d,引起 DA 能神经呈剂量依赖性损伤,同时给予 PAS 能减弱纤毛抑制系统作用,说明其可保护牡蛎免受锰神经毒性的影响^[10]。PAS 可使染锰大鼠血、脑锰浓度明显下降,脑前列腺素 E₂ 水平下降和谷胱甘肽水平增高,血浆催乳激素水平下降,活动度和进食量增加,表明 PAS 能有效地减轻染锰大鼠体内锰负荷、神经炎症、氧化应激和运动损伤^[11]。本研究显示,无论是染锰 8 周还是 12 周, PAS-Na 对亚慢性锰暴露致 GABA_AR mRNA 或蛋白表达异常改变的预防性干预作用明显。

从突触清除 GABA,主要依靠 GABA 转运蛋白。GAT 是突触前膜、神经胶质细胞膜或囊泡膜上的糖蛋白,是第一个被确定的转运体家族成员,它可选择性地与突触间隙的 GABA 结合,然后将其转运入细胞或囊泡内,终止 GABA 的抑制作用,调控突触间信息的传递。GAT-1 是有高亲和力的 GABA 转运体,也是神经系统中最重要 GABA 转运蛋白,约占脑中 GABA 转运体的 80%。ANDERSON 等^[3]研究发现,锰暴露使大鼠黑质、尾状核 GAT-1 mRNA 表达的改变,可能是锰与 DNA 发生交联反应,导致基因转录效能改变;大鼠黑质 GAT-1 蛋白质表达下降可能是锰促使 GABA_AR 亚基通过苏氨酸蛋白激酶产生磷酸化所致。体外研究显示,染锰(500 mmol/L Mn)可激活小胶质细胞苏氨酸蛋白激酶活性^[12]。本研究发现,短期染锰停止暴露 6 周的大鼠基底核 GAT-1 mRNA 表达均值明显降低,低、中剂量 PAS-Na 治疗使其基底核 GAT-1 mRNA 表达明显增高,恢复接近对照组水平;亚慢性染锰停止暴露 6 周的大鼠基底核 GAT-1 mRNA 表达均值明显增高,高剂量 PAS-Na 治疗使其明显下降,尚未恢复接近对照组水平,提示无论是短期还是亚慢性染锰停止暴露 6 周后,锰对大鼠基底核 GAT-1 mRNA 表达的损害都呈进行性改变, PAS-Na 对其有治疗性干预作用,尤以对亚急性损害的干预效果较好,这与锰中毒病人早期应用 PAS-Na 治疗效果较好相吻合,支持文献结论^[4-5]。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] DYDAK U, JIANG YM, LONG LL, et al. *In vivo* measurement of brain GABA concentrations by magnetic resonance spectroscopy in smelters occupationally exposed to manganese[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(2): 219-224.
- [2] 欧超燕, 黄明立, 姜岳明, 等. 对氨基水杨酸钠对染锰大鼠基底核氨基酸类神经递质含量的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 422-425.
- [3] ANDERSON JG, FORDAHL SC, COONEY PT, et al. Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(6): 1044-1053.
- [4] JIANG YM, MO XA, DU FQ, et al. Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study[J]. J Occup Environ Med, 2006, 48(6): 644-649.
- [5] 覃卫平, 梁天佳, 姜岳明, 等. 对氨基水杨酸钠治疗慢性中度锰中毒一例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(8): 619-620.
- [6] ZHENG W, JIANG YM, ZHANG Y, et al. Chelation therapy of manganese intoxication with para-aminosalicylic acid(PAS) in Sprague-Dawley rats[J]. Neurotoxicology, 2009, 30(2): 240-248.
- [7] BURTON NC, SCHNEIDER JS, SYVERSEN T, et al. Effects of chronic manganese exposure on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter markers in the nonhuman primate brain[J]. Toxicol Sci, 2009, 111(1): 131-139.
- [8] ASCHNER M, ERIKSON KM, HERRERO HERNÁNDEZ E, et al. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology[J]. Neuromolecular Med, 2009, 11(4): 252-266.
- [9] CHANDRA SV, SHUKLA GS. Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water[J]. J Neurochem, 1981, 36(2): 683-687.
- [10] NELSON M, HUGGINS T, LICORISH R, et al. Effects of p-Aminosalicylic acid on the neurotoxicity of manganese on the dopaminergic innervation of the cilia of the lateral cells of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2010, 151(2): 264-270.
- [11] SANTOS AP, LUCAS RL, ANDRADE V, et al. Protective effects of ebselen (Ebs) and para-aminosalicylic acid(PAS) against manganese (Mn)-induced neurotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(3): 394-402.
- [12] BAE JH, JANG BC, SUH SI, et al. Manganese induces inducible nitric oxide synthase(iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells[J]. Neurosci Lett, 2006, 398(1/2): 151-154.

(收稿日期: 2012-02-03)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 郭薇薇; 校对: 张晶)