

锰染毒12周大鼠体内锰分布及纹状体的病理损伤

戎艳, 唐亮, 殷锐, 张广妍, 孙道远

摘要: [目的] 研究锰染毒12周大鼠体内锰的组织分布特点, 以及高锰蓄积对纹状体的病理损伤。[方法] SD雄性大鼠($n=10$)腹腔注射 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/kg体重, 1次/d, 5 d/周, 持续染毒12周, 同时设置对照组($n=10$), 腹腔内注射与染毒组等体积的生理盐水, 周期相同。染毒结束, 采用透射电镜观察两组大鼠($n=2$)大脑纹状体病理改变; 采用电感耦合等离子体发射光谱检测两组大鼠($n=8$)各组织内锰含量。[结果] 与对照组相比, 染毒组大鼠体重增长缓慢。染毒12周后, 除肺、小脑外, 肝、胃、小肠、结肠、直肠、脾、肾、大脑、睾丸、心脏、毛发均有锰含量增高($P<0.05$)。染毒组大鼠大脑组织锰含量 $[(1.29 \pm 0.05) \mu\text{g/g组织}]$ 高于对照组 $[(0.65 \pm 0.13) \mu\text{g/g组织}]$ ($P=0.001$)。透射电镜观察可见纹状体神经元内大量脂褐素沉积。[结论] 锰在慢性锰中毒大鼠多组织贮留, 主要影响消化系统、肾脏、睾丸以及大脑。锰的神经毒性可能与氧化损伤有关。

关键词: 锰; 慢性锰中毒; 分布; 纹状体; 病理损伤

Manganese Distribution in Rats with Manganese Poisoning for 12 Weeks and Related Pathological Striatal Lesion RONG Yan, TANG Liang, YIN Rui, ZHANG Guang-yan, SUN Dao-yuan (Department of Poisoning Control, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China). Address correspondence to SUN Dao-yuan, E-mail: dysun@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the distribution characteristics of manganese in rats' tissues with 12-week manganese poisoning, and to observe the potential striatal lesion after high manganese accumulation. [Methods] Twenty adult male SD rats were divided into one control group ($n=10$) and one manganese group ($n=10$), which were administered with saline and 15 mg/kg body weight manganese intraperitoneal injection respectively, once a day and 5 days a week for 12 weeks. Then, pathological changes of corpus striatum were observed by transmission electron microscope ($n=2$ for each group) and manganese contents in rats' tissues were detected by inductively coupled plasma mass spectrometry ($n=8$ for each group). [Results] Compared with the control group, the rats exposed to manganese showed a slow increase of body weight. After 12 weeks of designed treatment, except lung and cerebellum, the manganese contents in the samples of liver, stomach, small intestine, colon, rectum, spleen, kidney, brain, testis, heart, hair were higher than those of the controls ($P<0.05$). The manganese content in the brain of the manganese group was higher $[(1.29 \pm 0.05) \mu\text{g/g tissue}]$ than that of the control group $[(0.65 \pm 0.13) \mu\text{g/g tissue}]$ ($P=0.001$). Meanwhile, a large amount of lipofuscin was accumulated in striatal neurons observed under transmission electron microscope. [Conclusion] Manganese could accumulate in multiple tissues of rats after chronic manganese poisoning and affect digestive system, kidney, testis, and brain. Oxidative damage may be involved in the observed neurotoxicity.

Key Words: manganese; chronic manganese poisoning; distribution; striatal; lesion

慢性锰中毒发病机制目前尚未阐明。国内研究提示15 mg/kg体重的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 染毒3个月, 可建立大鼠锰神经毒性模型^[1]。国外有报道称10~15 mg/(kg·d)剂量的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 腹腔注射30 d可成功建立大鼠锰中毒模型, 观察到大鼠神经行为学的改变^[2-3], 美国卫生与人类服务部出版的*Toxicological Profile for Manganese*^[4]提出大鼠慢性锰中毒模型建立的无机锰

暴露剂量为 $\geq 10\sim 20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。

本研究在国内外研究基础上, 采用大鼠腹腔注射15 mg/(kg·d)的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1次/d, 5 d/周, 持续染毒12周, 建立大鼠慢性锰染毒模型, 并对锰在大鼠体内分布情况及纹状体病理损伤特点进行研究, 为慢性锰中毒的机制研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康雄性SD大鼠20只, 体重 $(150 \pm 20) \text{ g}$ (由上海市肺科医院实验动物中心提供)。大鼠接受每日明暗各12 h光照节律, 昼夜交替。饲以普通饲料, 自由进食及饮水, 笼具及饮水瓶等用具为

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14357

[基金项目] 同济大学附属上海市肺科医院课题(编号: fk1119); 新增法定职业病防治关键技术研究(编号: 201402021)

[作者简介] 戎艳(1984—), 女, 硕士, 公卫医师; 研究方向: 职业卫生; E-mail: China-rongyan.163@163.com

[通信作者] 孙道远, E-mail: dysun@163.com

[作者单位] 同济大学附属上海市肺科医院中毒科, 上海 200433

非含锰制品。

1.1.2 试剂 二氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 购于上海医药集团; 多聚甲醛(质量分数为4%)–戊二醛(质量分数为2.5%)固定液: 多聚甲醛40 g, 0.2 mmol/L磷酸缓冲液500 mL, 质量分数为25%的戊二醛溶液100 mL, 双蒸水加至1000 mL, 4℃密封保存。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 大鼠适应性喂养1周后, 称量体重, 随机分为对照组($n=10$)、染毒组($n=10$)。

1.2.2 染毒 染毒组大鼠腹腔注射 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 注射量为15 mg/kg体重, 对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 染毒周期1次/d, 5 d/周, 持续12周。每周记录1次大鼠体重。

1.3 观察指标

1.3.1 一般情况 观察动物活动情况; 体重、进食量变化; 外观特征、毛色、活动性等。

1.3.2 透射电镜观察 每组2只大鼠作透射电镜观察, 实验前12 h, 大鼠禁食, 不禁水。乌拉坦腹腔注射麻醉, 开胸腔, 完全暴露心脏, 经心尖推注生理盐水0.5 mL后, 迅速剪开右心耳, 继续匀速灌注生理盐水50~80 mL, 直至由右心耳流出生理盐水无色透明, 再用4%多聚甲醛–2.5%戊二醛固定液匀速灌注200 mL。后取大鼠脑组织纹状体, 切成1 mm³小块, 固定液4℃固定保存。按电镜常规作超薄切片, 飞利浦EM430型透射电镜观察。

1.3.3 组织锰含量检测 (1) 每组另外8只大鼠作组织锰含量检测分析。乌拉坦腹腔注射麻醉后, 取出大脑、小脑、肺、心脏、肝、胃、小肠、升结肠、降结肠、直肠、肾、脾、睾丸、毛发, 称重后置于EP管–80℃保存。(2) 用METTLER(瑞士)分析天平称量组织湿重, 然后置于消化管中, 加入硝酸–过氧化氢(3:2)溶液5 mL、高氯酸0.5 mL, 室温放置12 h, 再经80℃, 5 min、110℃, 1 h、140℃, 12 h、180℃, 2 h消化, 用Optima 7000DV型电感耦合等离子体(美国PE公司)发射光谱分析各组织中锰的含量。

1.4 统计学分析

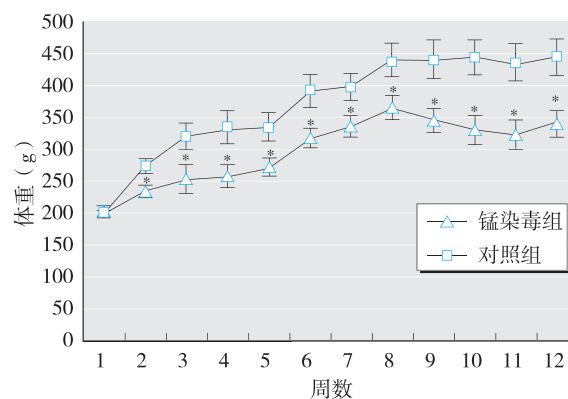
使用SPSS 16统计软件对数据进行分析。各组织中锰含量用“均数 ± 标准差”表示, 组间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

和正常对照组相比, 染毒组大鼠出现不同程度的

活动减少、反应迟钝、行走平衡性降低; 染毒组大鼠毛发干枯, 发黄; 染毒组大鼠体重增长缓慢, 由图1可见, 从染毒7 d后开始, 染毒组大鼠体重明显低于对照组($P<0.05$), 染毒后第8周开始, 染毒组大鼠体重呈现负增长现象, 对照组大鼠体重进入平台期。

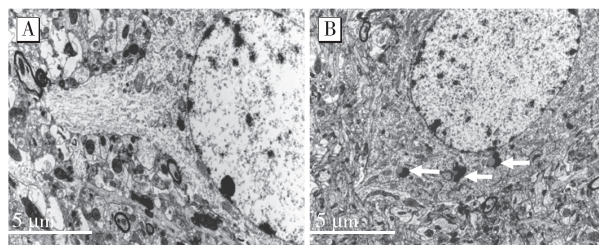


[注]*: 与对照组大鼠比较, $P<0.05$ 。

图1 2组大鼠体重变化

2.2 透射电镜观察

对照组大鼠大脑纹状体神经元镜像均匀良好, 细胞器丰富, 结构正常(图2A)。染毒组大鼠纹状体镜下出现大量脂褐素沉积, 神经元内粗面内质网肿胀, 并出现脱颗粒现象(图2B)。



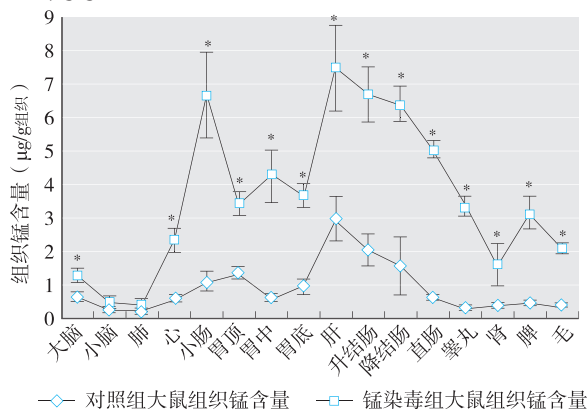
[注]A: 对照组; B: 锰染毒组。

图2 2组大鼠纹状体神经元透射电镜照片

2.3 组织锰含量测定

由图3可见, 染毒前, 锰在各组织的分布顺序为: 肝>升结肠>降结肠>胃顶>胃底>小肠>大脑>胃中>直肠>心>脾>肾>睾丸>小脑>毛发>肺, 消化系统锰含量最高, 其次是大脑, 毛发及肺组织中的锰含量最低。锰染毒12周后, 锰在各组织的分布顺序为: 肝>升结肠>小肠>降结肠>直肠>胃中>胃底>胃顶>睾丸>脾>心>毛发>肾>大脑>小脑>肺, 消化系统的锰含量仍为最高, 其次是睾丸, 毛发、肾组织、脑组织、肺组织中的锰含量最低。锰染毒12周后, 除肺($P=0.187$)、小脑($P=0.073$)外, 余各部位组织内锰含量均增高(P 值均 <0.05)。染毒组大鼠大脑组织锰含量($[1.29 \pm 0.05] \mu\text{g/g}$ 组织)高于对照组($[0.65 \pm$

0.13) $\mu\text{g/g}$ 组织]($P=0.001$)。



[注]*: 与对照组大鼠比较, $P<0.05$ 。

图3 2组大鼠各组织锰含量分布情况

3 讨论

本次研究发现, MnCl_2 进入体内后主要蓄积于肝脏和胃肠组织, 消化系统内锰含量为对照组2~6倍。从染毒开始至第6周, 染毒组大鼠进食量多于对照组, 但体重增长较对照组缓慢; 而从进食量与对照组基本相当的第7周开始, 染毒大鼠体重呈现下降趋势, 提示高锰蓄积可能对胃肠消化、吸收功能的影响。有研究发现, 锰在消化系统主要通过钙、亚铁离子相同载体氨基酸饱和转运的方式吸收, 而载体对锰的亲合力以及最大吸收速率更高^[5], 导致消化系统成为锰的主要受累系统。

锰染毒12周后, 与对照组相比, 染毒组大鼠除肝、消化系统外, 肾、大脑、睾丸、心脏、毛发锰含量均增高($P<0.05$), 而肺组织及小脑内锰含量基本无变化。锰在多组织内蓄积, 提示锰进入体内能够与广泛存在体内的某种蛋白结合, 而肺组织及小脑组织该种蛋白缺乏。染毒大鼠大脑组织锰含量[(1.29 ± 0.05) $\mu\text{g/g}$ 组织]是对照组[(0.65 ± 0.13) $\mu\text{g/g}$ 组织]的1.98倍($P<0.05$), 说明锰可通过血脑屏障在脑内蓄积, 使脑组织成为主要受累器官之一。

慢性锰中毒临床表现主要为帕金森病, 何凤生等^[6]提出其病理改变以纹状体神经元变性为主, 其中可能的原因包括脑组织内的锰蓄积引起的自由基形成、能量代谢障碍等, 但均尚无定论。因此, 本研究进而重点观察了纹状体的病理特征。通过透射电镜观察时发现染毒组大鼠纹状体神经元中大量脂褐素沉积。脂褐素被认为是细胞内不饱和脂肪过氧化的产物, 是细胞氧化损伤的表现之一。这提示染毒组大鼠脑组织已发生了氧化损伤。Schultheis^[7]、Usenovic等^[8]在研究帕金森病的发病机制中亦观察到小鼠脑内大量脂

褐素沉积, 以及疾病的潜在蛋白表达增多。本研究结论为慢性锰中毒后出现帕金森病的主要临床表现提供又一病理基础。纹状体内多巴胺脂质过氧化与脂褐素形成, 以及与锰神经毒性的密切关系和发生机制, 仍有待于进一步研究。

本研究的不足之处为: (1) 仅对大鼠脑组织内锰含量初步研究, 而未进行分区分析。实际上, 脑组织不同区域内锰含量的分布情况对进一步掌握锰对脑组织的病理损伤特点以及揭示慢性锰中毒机制具有重要的理论意义。因此, 今后研究可对锰在脑组织内的分布情况进行深入研究。(2) 纹状体病理损伤的观察例数为每组2例, 样本量较少。后续研究将加大样本量进行病理观察, 进一步验证氧化损伤在慢性锰中毒发病过程中的作用。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 张振明, 黄世文. 牛磺酸对锰致大鼠前额皮质神经毒性损害的干预研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008, 26(10): 601-604.
- [2] Hiney JK, Srivastava VK, Dees WL. Manganese induces IGF-1 and cyclooxygenase-2 gene expressions in the basal hypothalamus during prepubertal female development[J]. Toxicol Sci, 2011, 121(2): 389-396.
- [3] Moreno JA, Yeomans EC, Streifel KM, et al. Age-dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction[J]. Toxicol Sci, 2009, 112(2): 394-404.
- [4] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for manganese[EB/OL]. [2014-05-01]. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf>.
- [5] 李晓丽, 吕林, 解竞静, 等. 锰在鸡肠道中吸收的特点、影响因素及分子机制[J]. 动物营养学报, 2013, 25(3): 486-493.
- [6] 何凤生, 薛启冀. 神经系统中毒及代谢性疾病[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 52-56.
- [7] Schultheis PJ, Fleming SM, Clippinger AK, et al. Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited α -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(10): 2067-2082.
- [8] Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, et al. Deficiency of ATP13a2 leads to lysosomal dysfunction, α -synuclein accumulation and neurotoxicity[J]. J Neurosci, 2012, 32(12): 4240-4246.

(收稿日期: 2014-05-15)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)