

碎片形成。这是因为砷在代谢过程中能够产生大量活性氧自由基(ROS)^[6],一些含巯基酶如丙酮酸脱氢酶、磷酸酯酶等与 ROS 结合后活性受到抑制,直接影响细胞代谢、氧化过程以及 DNA 合成与修复,从而对 DNA 造成损伤。

DNA 断裂可以通过 DNA 修复酶得以修复。研究表明,XRCC1 基因在 DNA 单链损伤修复中起着重要作用^[7]。本研究结果显示,随着染毒剂量增加,XRCC1 蛋白表达明显降低,低剂量组较对照组表达有增高趋势,原因可能与低剂量砷引起生精细胞兴奋效应有关。大鼠 XRCC1 蛋白表达与 DNA 损伤之间呈负相关,提示 XRCC1 基因低表达可抑制 DNA 重新连接,丧失由砷所引起 DNA 损伤修复功能。进一步表明 XRCC1 可能在维持遗传稳定性方面起着重要作用,从而预防肿瘤的发生。但砷是如何诱导 XRCC1 表达降低的分子生物学机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Hsieh FI, Hwang TS, Hsieh YC, et al. Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan [J]. *Environ Health Perspect* 2008, 116(4): 532-536.
- [2] Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF, et al. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway [J]. *Chem Res Toxicol* 2008, 21(8): 1562-1569.
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res* 1998, 175(1): 184-191.
- [4] Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice [J]. *Human and Experimental Toxicology*, 2004, 23(8): 399-403.
- [5] 陈伟, 陆祥, 舒小林, 等. 砷对大鼠生精细胞及端粒酶逆转录酶表达影响 [J]. *中国公共卫生* 2008, 24(11): 1382-1384.
- [6] 李冰, 张新玉, 李昕, 等. 无机砷的肝细胞毒性和氧化应激 [J]. *中国工业医学杂志* 2009, 22(3): 209-210.
- [7] 方道奎, 张建清, 胡大林, 等. XRCC1 在 MMS 致人细胞 DNA 单链断裂修复中的作用 [J]. *中山大学学报: 医学科学版* 2009, 30(8): 47-51.

收稿日期: 2011-09-19

(解学魁编辑 郑新校对)

• 实验研究 •

毒死蜱对大鼠脑组织 RAGE 介导 Gq-PKC 信号转导途径影响

张峰, 付志华, 白宇, 李素平

摘要:目的 探讨 48% 毒死蜱(CPF)对大鼠胆碱酯酶活力及晚期糖基化终末产物受体(RAGE)介导的 Gq-蛋白激酶 C(PKC)信号转导途径影响。方法 将大鼠随机分为 CPF 低(1/40LD₅₀)、中(1/20LD₅₀)、高(1/10LD₅₀) 3 个剂量组和生理盐水对照组,经口染毒 28 d 后,用三氯化铁比色法检测大鼠全血胆碱酯酶活力;荧光免疫组化法检测脑组织 RAGE、PKC 的表达;蛋白质印迹法(western blot)检测脑组织中 Gq 蛋白的表达。结果 全血胆碱酯酶活力随染毒剂量的增加而降低,对照组和 CPF 低、中、高剂量组三氯化铁比色法测定值分别为(33.75 ± 5.03)、(29.70 ± 4.01)、(10.40 ± 1.95)、(5.25 ± 0.05);RAGE、Gq 蛋白、PKC 的表达均随染毒剂量的增加而增高,对照组和 CPF 低、中、高剂量组 RAGE 免疫反应平均光密度值分别为(0.32 ± 0.01)、(2.01 ± 0.09)、(5.03 ± 0.05)、(8.02 ± 0.04),Gq 蛋白的相对含量分别为(0.84 ± 0.01)、(0.90 ± 0.01)、(1.10 ± 0.02)、(1.59 ± 0.01),PKC 免疫反应平均光密度值分别为(0.12 ± 0.01)、(2.01 ± 0.03)、(3.52 ± 0.02)、(5.01 ± 0.08)。结论 CPF 主要通过抑制胆碱酯酶的活力对机体造成损伤,RAGE、Gq 蛋白、PKC 的高表达可能参与了 CPF 中毒神经系统病理性信号转导。

关键词: 48% 毒死蜱(CPF);胆碱酯酶;晚期糖基化终末产物受体(RAGE);信号转导

中图分类号: R 139

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1472-03

Effect of chlorpyrifos on RAGE-Gq-PKC signal transduction of brain tissue in rats

ZHANG Feng, FU Zhi-hua, BAI Yu, et al. (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province 030001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of 48% chlorpyrifos on cholinesterase activity and signal transduction pathway in rats. **Methods** Thirty-two rats were randomly divided into low-dose (1/40 median lathal dose [LD₅₀]), moderate-dose (1/20 LD₅₀), high-dose (1/10 LD₅₀) groups and saline control group. The rats were treated by oral gavage for 28 days. The activity of whole blood cholinesterase was detected with ferric chloride colorimetric method; the expression of the receptor of advanced glycation end-products (RAGE) and protein kinase C (PKC) in brain tissue were detected with the immunohistochemistry; the expression of Gq protein in brain tissue were detected with western

作者单位: 山西医科大学公共卫生学院,山西太原 030001

作者简介: 张峰(1985-),男,山西汾阳人,硕士在读,研究方向:农药毒理。

通讯作者: 李素平, E-mail: LISUPING56@126.com

blot. **Results** The activity of whole blood cholinesterase decreased with the increase of exposure, with the value of 33.75 ± 5.03 , 29.70 ± 4.01 , 10.40 ± 1.95 and 5.25 ± 0.05 for control group, low-, moderate- and high-dose groups. The expressions of RAGE, Gq protein and PKC increased with the increase of exposure, with the RAGE expression of 0.32 ± 0.01 , 2.01 ± 0.09 , 5.03 ± 0.05 , 8.02 ± 0.04 , Gq protein expression of 0.84 ± 0.01 , 0.90 ± 0.01 , 1.10 ± 0.02 , 1.59 ± 0.01 and PKC expression of 0.12 ± 0.01 , 2.01 ± 0.03 , 3.52 ± 0.02 , 5.01 ± 0.08 for control group, low-, moderate- and high-dose group, respectively. **Conclusion** Chlorpyrifos shows toxicity to rats by inhibiting the activity of cholinesterase. The high expression of RAGE, Gq protein and PKC might be involved nervous system pathological signal transduction in chlorpyrifos poisoning.

Key words: 48% chlorpyrifos; cholinesterase; RAGE; signal transduction

毒死蜱(chlorpyrifos, CPF)是目前世界上生产和销售最大的有机磷杀虫剂之一,广泛应用于农作物病虫害和家庭卫生害虫防治之中,是磷酸酯类有机磷杀虫剂,其通用名为乐斯本(lorsban),原药为白色颗粒状结晶,室温下稳定,易溶于大多数有机溶剂^[1]。一般加工配制成乳油或颗粒剂,可用无水酒精、三氯硫磷及 2-羟基-3,5,6-三氯吡啶为原料制得。有研究认为,毒蕈碱乙酰胆碱受体是 G 蛋白偶联受体超家族中的一员,具有该家族特征性的结构和信号转导方式^[2],即通过磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)-二酯酰甘油(diacylglycerol, DAG)-蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 通路转导信号^[3]。本实验通过 SD 大鼠的 CPF 中毒模型,测定细胞膜受体晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)和与受体偶联的 Gq 蛋白介导的信号,旨在探讨该途径在 CPF 诱导的神经毒性作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 毒死蜱(安徽金泰农药化工有限公司) Gq 蛋白的多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(Santa Cruz 公司) 兔抗 RAGE 抗体、兔抗 PKC 抗体(武汉博士德生物工程有限公司) 荧光素标记羊抗兔 IgG(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 动物分组 健康雌性 SD 大鼠 32 只(动物合格证号:0107010,由山西医科大学实验动物中心提供),体重 200~220 g,活动能力相近,适应性喂养 1 周,随机分为 4 组,即生理盐水对照组、48% CPF 低剂量组($1/40 LD_{50}$)、48% CPF 中剂量组($1/20 LD_{50}$)和 48% CPF 高剂量组($1/10 LD_{50}$), $LD_{50} = 163 \text{ mg/kg}$,每组 8 只。

1.3 方法

1.3.1 动物染毒 48% CPF 用生理盐水稀释成所需浓度,按实验分组要求以 $1 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给各剂量组动物灌胃,对照组大鼠以 $1 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 生理盐水灌胃,连续染毒 28 d。所有大鼠均在温度 $22 \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$ 湿度(60 ± 5)%的环境下饲养,自由饮水、进食。

1.3.2 一般情况观察 每日观察其出现的外观体征和

行为改变,记录各症状出现的时间和先后次序,包括食欲、活动、被毛、分泌物、呼吸等。称动物体重并记录。

1.3.3 动物取材 大鼠在 0.14% 戊巴比妥钠腹腔麻醉下,腹主动脉采血,部分注入抗凝管留取全血,用于测定全血胆碱酯酶活力。开颅取脑组织,冰上剥离全脑,部分用预冷生理盐水冲洗全脑组织中残留的血液,部分经 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,切片,做免疫组化,部分贮存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,用于提取组织蛋白,测定 Gq 蛋白的相对含量。

1.3.4 检测方法

1.3.4.1 免疫组化法^[4] 免疫组化法是用标记的特异性抗体对组织切片或细胞标本中某些化学成分分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究的方法,本研究用三氯化铁比色法检测全血胆碱酯酶活力;荧光免疫组织化学技术检测全脑组织 RAGE、PKC 的表达。将兔抗 RAGE、兔抗 PKC 一抗和荧光素标记羊抗兔 IgG 二抗滴加在经包埋、脱蜡、修复的全脑组织切片上,荧光显微镜检测分析,用 BI-2000 图像分析系统计算平均光密度并记录结果。

1.3.4.2 蛋白质印迹法(western blot 法)^[5] 是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。本研究用组织蛋白提取及免疫印迹法测定 Gq 蛋白含量,全脑组织蛋白提取后制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,跑胶后转移蛋白至 PVDF 膜上封闭,加 Gq 蛋白多克隆抗体一抗和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,用凝胶电泳图像分析系统对免疫印迹结果分析,计算待测蛋白的相对含量,即 Gq 蛋白与 β -actin 光密度的比值。

1.4 统计分析 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 16.0 统计软件对各组资料进行比较,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 对照组大鼠未见异常表现,染毒组大鼠出现活动减少,其中 CPF 高剂量组大鼠有口鼻

分泌物增多、抽搐、竖毛的表现。

2.2 大鼠体重变化(表 1) 实验结束时,低、中剂量组大鼠体重增加,高剂量组大鼠体重减少,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重变化(g)

组别	大鼠数	始重	终重	增重
对照组	8	202.50 ± 7.72	218.75 ± 2.22	16.25 ± 2.08
CPF 低剂量组	8	210.25 ± 8.46 ^a	245.75 ± 24.19 ^a	35.50 ± 5.32 ^b
CPF 中剂量组	8	212.00 ± 11.60 ^a	242.25 ± 20.02 ^a	30.25 ± 3.86 ^b
CPF 高剂量组	8	205.50 ± 16.42 ^a	199.00 ± 26.63 ^a	-6.50 ± 1.21 ^b

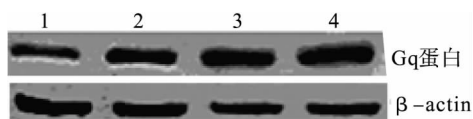
注:与对照组比较, ^a $P > 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

2.3 对大鼠全血胆碱酯酶活力的影响 全血胆碱酯酶活力三氯化铁比色法测定值对照组和 CPF 低、中、高剂量组分别为(33.75 ± 5.03)、(29.70 ± 4.01)、(10.40 ± 1.95)、(5.25 ± 0.05),大鼠全血胆碱酯酶活力随染毒剂量的增加而降低($F = 52.465$, $P < 0.05$)。中、高剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);低剂量组与对照组比较,差异无统计学意义($P = 0.178$)。

2.4 对大鼠全脑组织中 RAGE 表达的影响 RAGE 免疫反应平均光密度值对照组和 CPF 低、中、高剂量组分别为(0.32 ± 0.01)、(2.01 ± 0.09)、(5.03 ± 0.05)、(8.02 ± 0.04),大鼠 RAGE 免疫反应平均光密度值随染毒剂量的增加而增加($F = 11261.041$, $P < 0.05$);各剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 对大鼠全脑组织中 PKC 表达的影响 PKC 免疫反应平均光密度值对照组和 CPF、低、中、高剂量组分别为(0.12 ± 0.01)、(2.01 ± 0.03)、(3.52 ± 0.02)、(5.01 ± 0.08),大鼠 PKC 免疫反应平均光密度值随染毒剂量的增加而增加($F = 6736.462$, $P < 0.05$);各剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 对大鼠全脑组织中 Gq 蛋白表达的影响(图 1) Gq 蛋白的相对含量对照组和 CPF 低、中、高剂量组分别为(0.84 ± 0.01)、(0.90 ± 0.01)、(1.10 ± 0.02)、(1.59 ± 0.01),大鼠全脑组织中 Gq 蛋白的表达随染毒剂量的增加而增加($F = 1985.571$, $P < 0.05$),有明显的剂量-反应关系;各剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:1:对照组;2:低剂量组;3:中剂量组;4:高剂量组。

图 1 大鼠全脑组织 Gq 蛋白免疫印迹图

3 讨论

有机磷农药毒性作用机制是抑制胆碱酯酶的活

力,使胆碱酯酶失去水解乙酰胆碱的能力,造成乙酰胆碱在体内大量蓄积,引起一系列中毒症状^[6]。本研究通过 48% CPF 对大鼠亚急性染毒,大鼠出现活动减少,高剂量组大鼠有口鼻分泌物增多、抽搐、竖毛的表现,符合乙酰胆碱在体内聚集引起的毒蕈碱样、烟碱样症状。全血胆碱酯酶活力随染毒剂量的增加而降低,随着染毒剂量的增加,胆碱酯酶活力抑制程度加重。目前对 RAGE 在神经系统发病中的研究多集中在家族性淀粉样多神经病、阿尔茨海默病、克-雅病的神经功能不全等疾病上,本实验用抗 RAGE 抗体荧光免疫组化法检测全脑组织中 RAGE 表达情况,结果证实 RAGE 表达随染毒剂量的增加而增加,提示 CPF 激活了 G 蛋白偶联的 RAGE 受体,使 G 蛋白活化。G 蛋白在跨膜信息传递中的中心地位,决定了 G 蛋白信号转导系统在生理和病理状态下信息传递的重要性,目前国内外对 CPF 信号转导的研究显示,腺苷酸环化酶对环磷酸腺苷的产生有调节作用,新生鼠染毒亚中毒剂量 CPF 可能会引起腺苷酸环化酶发生改变,从而干扰细胞信号调节^[7]。Gq 蛋白为 G 蛋白家族成员之一,是肌醇磷脂途径中膜受体和 PLC β 的中介物^[8],PKC 在神经系统中起着重要的作用,特别是对大脑的记忆和认知功能产生重要影响^[9]。本实验用抗 Gq 多克隆抗体,免疫印迹法检测全脑组织中的 Gq 蛋白表达情况,抗 PKC 抗体荧光免疫组化法检测全脑组织中 PKC 表达情况,结果证实 CPF 中毒全脑组织中 Gq 蛋白和 PKC 的表达均随染毒剂量的增加而增加,提示 RAGE 的激活使得 Gq 蛋白活化,激活的 Gq 将 PLC 激活,产生 DAG, DAG 激活 PKC 促进蛋白质磷酸化。CPF 亚急性中毒导致 RAGE-Gq-PKC 的高表达,提示它可能参与了 CPF 中毒神经系统病理性信号转导,成为 CPF 中毒出现功能障碍的原因之一。

参考文献

- [1] 王会平,伍一军. 毒死蜱的神经毒性作用及机制[J]. 环境与职业医学 2008, 25(3): 314.
- [2] 孙科,郭政东. M 受体-G 蛋白信号转导途径研究进展[J]. 国际药学研究杂志 2008, 35(2): 87.
- [3] 冯作化,药立波,周春燕. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社 2005: 132-134.
- [4] 李宁,杨国俊,乔明武,等. 铅对仔鼠学习记忆及其海马组织 TNF- α 表达影响[J]. 中国公共卫生 2011, 30(11): 1442-1444.
- [5] 徐振平,王聪睿,张艳芬,等. 心肌肥厚大鼠心肌细胞变化与 Cx43 表达[J]. 中国公共卫生 2010, 29(8): 1017-1019.
- [6] 王沛,田英,高宇,等. 孕妇有机磷农药代谢产物暴露水平检测[J]. 中国公共卫生 2009, 28(8): 470-471.
- [7] Meyer A, Seidler FJ, Aldridge JE, et al. Developmental exposure to terbutaline alters cell signaling in mature rat brain regions and augments the effect of subsequent neonatal exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos[J]. Toxicol Appl Pharmacol 2005, 203(2): 154-166.
- [8] Ghosh M, Smracka AV. Assay for G protein-dependent activation of phospholipase C beta using purified protein components[J]. Methods Mol Biol 2004, 237: 67-75.
- [9] 杨红,董海松,林逸玲,等. 蛋白激酶 C 神经保护作用的研究进展[J]. 医学综述 2009, 15(18): 2736-2738.

收稿日期: 2012-05-03

(刘铁编辑 郑新校对)