

甲基苯丙胺中毒大鼠相关脑区多巴胺能神经毒性研究*

徐 静 李艳明 曾晓锋[△] 赵永和 王尚文 李 桢[△]

(昆明医学院法医学院 云南 昆明 650500)

摘要 目的 探讨 MA 中毒多巴胺能神经毒性的损伤机制。方法 将 Wistar 大鼠 40 只,随机分成对照组 10 只和实验组 30 只(实验组分成三个亚组,分为末次给药后 1 天组、4 天组和 7 天组,n=10)。实验组给予 20mg/kg 的 MA 腹腔注射,对照组给予同样剂量的生理盐水,每天注射一次,注射时间为 20:00,连续注射 4 天。分别于末次给药后 1 天,7 天,14 天处死实验大鼠,用免疫组织化学染色法(S-P 法)和荧光分光光度计法检测大鼠中脑黑质致密区(SNC)、中脑腹侧被盖区(VTA)、前额叶皮质(PFC)以及纹状体(CPu)四个脑区的多巴胺神经元细胞的形态和数量的变化,对神经纤维进行灰度值分析。结果 1、黑质致密区和腹侧被盖区 TH 阳性细胞图像分析结果与细胞计数分析结果一致:与对照组相比,各实验组 TH 免疫反应阳性降低,差异具显著性($P<0.05$),d1 组开始降低($P<0.05$),d7 组达到低谷($P<0.01$),d14 天组黑质致密区和腹侧被盖区 TH 免疫反应阳性有不同程度的恢复($P<0.05$)。2、纹状体和前额叶皮质 TH 阳性纤维图像定量分析结果:各实验组 TH 免疫反应阳性均减低($P<0.05$),d7 组阳性反应最弱($P<0.01$),d14 组仍未恢复($P<0.05$)。3、黑质致密区、腹侧被盖区、纹状体及前额叶皮质荧光分光光度计检测 DA 递质含量结果:与上述免疫组化结果基本一致。结论 1、大鼠各脑区 TH 阳性表达和 DA 含量,均出现不同程度的减低。2、MA 中毒大鼠各脑区 DA 递质含量的变化与 TH 的变化结果基本一致。

关键词 甲基苯丙胺 酪氨酸羟化酶 多巴胺 免疫组织化学 荧光分光光度计

中图分类号 R95-3 R994.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)12-2230-04

Dopaminergic Toxicity in Related Brain Areas of Rats after Methamphetamine Intoxication*

XU Jing, LI Yan-ming, ZENG Xiao-feng[△], ZHAO Yong-he, WANG Shang-wen, LI Zhen[△]

(School of Forensic Medicine, Kunming Medical College, Kunming, 650500, China)

ABSTRACT Objective: To investigate injury mechanism of methamphetamine dopaminergic toxicity. **Methods:** 40 male rats were randomly divided into control group (n=10) and experimental group (dividing it into the first, fourth and seventh group after the last injection, n=10). Rats in the experimental group were intraperitoneal injected with MA(20mg/kg, 8 pm, ip $\times$ 4 d), and those in the control group were injected with saline with the same volume (20 mg $\cdot$ kg⁻¹, 8 pm, ip $\times$ 4 d). Through S-P TH antibody and spectrophotofluorometer in DA, the mentioned seven brain regions were examined, including SNC, VTA, PFC and CPu. The mentioned TH masculine cell and neurotic fibre were analysed by the image analysis system. **Results:** 1. The image analysing results was similar to the results of cell counting in the SNC and VTA TH masculine cell: Compared with relation group, TH immunity reaction masculine in the different experimental group reduces with obvious difference ($P<0.05$), d1 begins to reduce ($P<0.05$), d7 gets to the lowest level, ($P<0.01$) d14 SNC and VTA masculine cell regains to different degree ($P<0.05$). 2. The analysing results of TH masculine Neurotic Fibre Density in the PFC and CPu Compared with relation group, The changes of TH masculine Neurotic Fibre Density reduces with obvious difference, d1 begins to reduce, d7 gets to the lowest level, d14 masculine cell regains to different degree ($P>0.05$). 3. The results of analysing DA by SPF rat methamphetamine intoxication SNC, VTA and CPu: It is similar to the analysing results of the SNC, VTA, PFC and CPu TH immunohistochemistry results in five brain regions. **Conclusion:** 1. To different degrees, the reduction and changes appear in rat SNC, VTA, PFC and CPu, with dose dependent. 2. The changes of TH were consistent with rat methamphetamine intoxication and DA transmitter.

Key words: Methamphetamine; TH; dopamine; SPF; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R95-3 R994.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2230-04

前言

MA 俗称“冰毒”,属苯丙胺类中枢兴奋剂。其神经元毒性作用机制主要有:多巴胺信号转导的影响和 DA 的氧化作用

* 基金项目 国家自然科学基金项目(NO30660202);教育部春晖项目(NOZ2006-1-65003);云南省科技厅项目(NO2006GH22)

作者简介 徐静(1981-),女,山东威海人,硕士研究生,研究方向:毒品滥用的研究。徐静,李艳明,同为第一作者,对本文皆有同等贡献。

[△]通讯作者 李桢(1959-),女,教授,硕士生导师。E-mail:lizhenlaura@126.com

曾晓锋(1977-),男,讲师,研究方向:毒品滥用的研究。

(收稿日期 2011-01-03 接受日期 2011-01-28)

[1,2]、谷氨酸介导的兴奋性毒性作用[3]、氧化应激和细胞因子的形成[4-5]、线粒体功能紊乱[6]、诱导神经细胞发生凋亡[6]、神经胶质细胞的活化及高热[7]。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)为儿茶酚胺生物合成过程中的关键酶,是 DA 能神经元的标记酶。现结合 DA 能神经系统以及中毒/依赖的生物学结构基础,对 MA 中毒大鼠,SNC、VTA、CPu 以及 PFC 四个脑区 DA 合成的限速酶-TH 变化与神经递质 DA 的含量变化,探讨 MA 中毒多巴胺能神经毒性的损伤机制,并为寻找特异性拮抗剂来改善 MA 的神经毒性症状提供方向。

1 材料和方法

1.1 实验动物、给药方法及分组

健康成年 Wistar 雄性大鼠 40 只,鼠龄 3 个月,体重 240 ± 30 g,购自昆明医学院实验动物中心。随机分成对照组 10 只和实验组 30 只(实验组分成三个亚组,分为末次给药后 1 天组、4 天组和 7 天组, $n=10$)。实验组给予 20mg/kg 的 MA 腹腔注射,对照组给予同样剂量的生理盐水,每天注射一次,注射时间为 20:00,连续注射 4 天。分别于末次给药后 1 天,7 天,14 天处死实验大鼠,大鼠实验前在安静环境下适应性饲养 7 天(室温 $22 \pm 10^\circ\text{C}$,湿度 $55 \pm 5\%$),并保持 12 小时明暗交替光照,供应充足的食物和水,每天抓取两次。实验组在各时间点平行分为两组,一组行免疫组化法观察 TH 的变化,一组行荧光分光光度计法检测 DA 的变化。

1.2 主要实验仪器及试剂

荧光分光光度计,日本岛津公司;HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文报告分析系统,同济医科大学千屏影像工程公司;兔抗酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体,Chemicon 公司;S-P 即用

型超敏试剂盒 Kit-9707,福州迈新生物技术开发公司。

1.3 免疫组织化学检测黑质致密区、纹状体 TH 水平

石蜡切片,二甲苯脱蜡至水,抗原修复,正常山羊血清封闭,滴加一抗(浓度 1:500)、二抗,采用 DAB 显色,脱水,中性树脂胶封片。片中出现棕黄色颗粒为阳性结果。应用 HPIAS-1000 高清晰图文分析系统分别测量 SNC、VTA 多巴胺能神经元胞浆内 TH 阳性反应物的平均灰度值,以及 PFC 和 CPu 的 TH 阳性纤维的平均灰度值。

1.4 荧光分光光度计测多巴胺含量

分离 SNC、VTA、PFC 以及 CPu 四个脑区后用溶剂提取法分离出多巴胺,然后用荧光分光光度计测 MA 组和 NaCl 组的多巴胺含量。

1.5 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件包,对图像分析测定及细胞计数的均值,进行单因素方差分析及两两比较的 q 检验,数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,凡 $p < 0.05$,结果被认为有统计学意义。对 TH 阳性纤维密度的半定量结果进行多个样本比较的秩和检验(等级资料),检验效正水准 $\alpha = 0.008$,凡 $p < 0.008$,结果被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠中脑黑质致密区、中脑腹侧被盖区、前额叶皮、纹状体以及海马的多巴胺神经元及神经纤维免疫组织化学染色结果

各实验组 SNC、VTA、CPu 和 PFC 四个脑区 TH 阳性反应均减弱,以 d7 组降低最为明显,表现为 DA 能神经元数目减少、胞体固缩、轴突变短,DA 能神经纤维扭曲、稀疏甚至缺失。(见图 1-图 4)

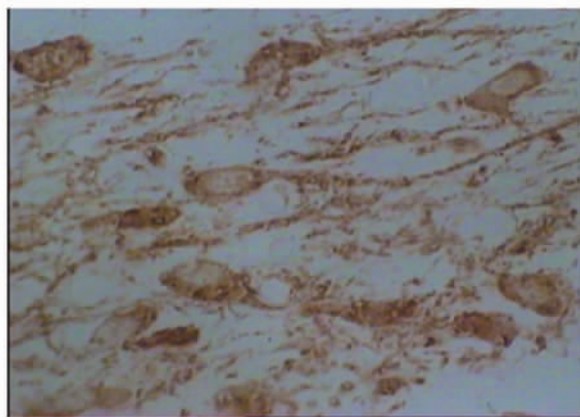


图 1 对照组 SNC 正常 TH 阳性细胞 $\times 400$

Fig.1 TH-positive cell in SNC in Control groups

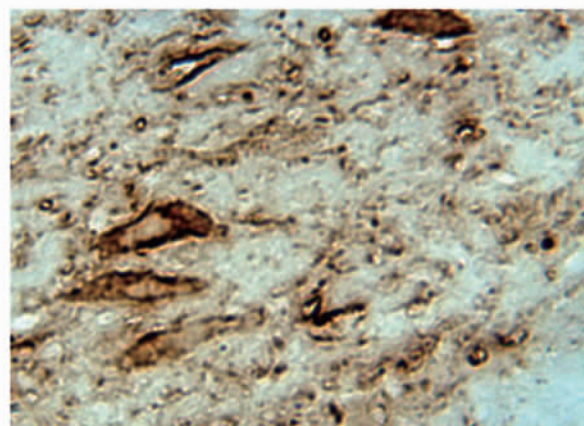


图 2 d7 组 SNC TH 阳性细胞 $\times 400$

Fig.2 TH-positive cell in SNC in 7d groups

2.2 中脑黑质致密区、腹侧被盖区 TH 阳性细胞灰度值

与对照组相比,d1 组开始降低 ($P < 0.05$),d7 达到低谷 ($P < 0.01$),d14 天组有所恢复 ($P < 0.05$)。(见表 1)

2.3 中脑黑质致密区、腹侧被盖区 TH 阳性细胞计数结果

与对照组相比,d1 组开始减少 ($P < 0.05$),d7 达到低谷 ($P < 0.01$),d14 组仍未恢复 ($P < 0.05$)。(见表 2)

2.4 MA 中毒大鼠 CPu 和 PFC 的 TH 阳性纤维灰度值分析结果

与对照组相比,各实验组 TH 免疫反应阳性均减低 ($P < 0.$

05),d7 组阳性反应最弱 ($P < 0.01$),d14 组仍未恢复 ($P < 0.05$)。(见表 3)

2.5 荧光分光光度计检测 DA 递质含量的变化结果(见表 4)

荧光分光光度计检测 DA 递质含量变化的结果与五个脑区抗 TH 标记 DA 能神经细胞的变化结果相一致。

3 讨论

国外研究学者认为,DA 的氧化作用系 MA 神经毒性损伤机制之一,其机制主要是 MA 能够通过多巴胺转运体进入神经

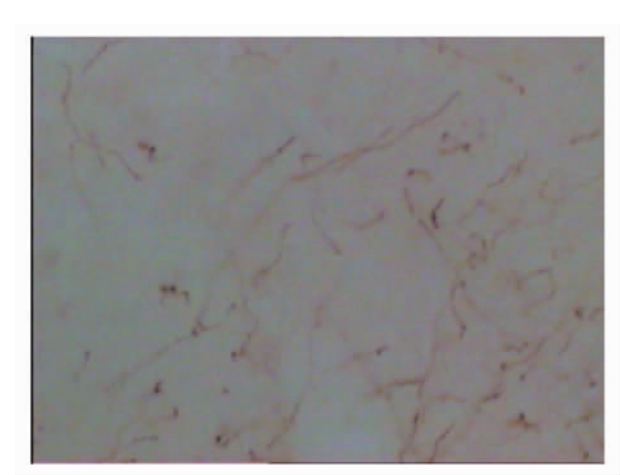


图 3 对照组 PFC 正常 TH 阳性纤维× 400
Fig.3 TH-positive Fibre in PFC in Control groups

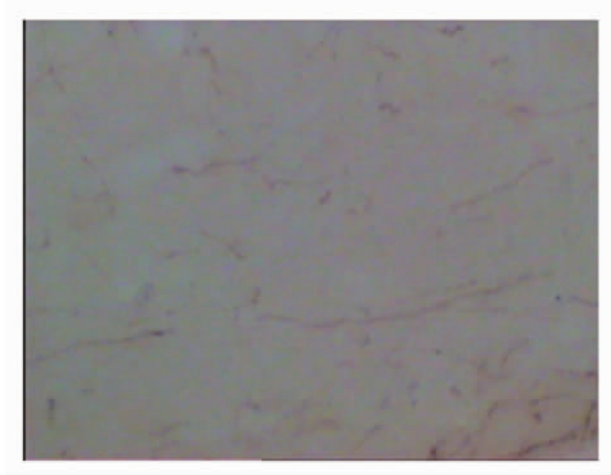


图 4 d7 组 PFC TH 阳性纤维× 400
Fig.4 TH-positive Fibre in PFC in 7d groups

表 1 各组中脑黑质致密区、腹侧被盖区 TH 阳性细胞灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the number of TH-positive gray scale value in SNC and VTA in different groups

Groups	n	SNC	VTA
Control	5	71.48± 4.77	71.48± 4.76
d1group	5	90.80± 5.06*	88.60± 5.34*
d7group	5	100.70± 5.41**	97.60± 3.64**
d14group	5	94.60± 4.39*	89.80± 5.06*

** P<0.01, compared with the control * P<0.05, compared with the control

表 2 各组中脑黑质致密区、腹侧被盖区 TH 阳性细胞数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the number of TH-positive cells in SNC and VTA in different groups

Groups	n	SNC	VTA
Control	5	36.40± 4.03	38.40± 5.41
d1group	5	29.80± 3.96**	23.80± 3.89**
d7group	5	16.60± 2.71**	14.80± 2.38**
d14group	5	28.40± 6.58*	25.80± 6.53**

** P<0.01, compared with the control * P<0.05, compared with the control

表 3 前额叶皮质和纹状体 TH 阳性纤维灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the number of TH-positive gray scale value in PFC and CPu in different groups

Groups	n	PFC	CPu
Control	5	115.80± 3.27	123.60± 4.04
d1group	5	119.90± 4.32*	131.40± 4.56*
d7group	5	131.00± 2.55**	148.40± 4.28**
d14group	5	119.00± 2.55*	130.80± 6.76*

** P<0.01, compared with the control * P<0.05, compared with the control

表 4 各组中脑黑质致密区、腹侧被盖区、前额叶皮质以及纹状体 DA 递质含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The variation of DA levels in SNC,VTA,CPu and PFC in different groups

Groups	n	SNC	VTA	PFC	CPu
Control	5	1243.5± 189.2	1239.6± 172.8	268.3± 32.6	639.1± 87.1
d1group	5	896.0± 196.7**	886.3± 159.8**	172.3± 61.7*	410.3± 50.9*
d7group	5	617.3± 123.1**	628.9± 131.2**	128.1± 51.8**	199.7± 61.7**
d14group	5	987.1± 194.9*	990.3± 186.8**	169.7± 73.9*	230.2± 64.3*

** P<0.01, compared with the control * P<0.05, compared with the control

元和神经末梢,置换出 DA,使 DA 大量外流到突触间隙,通过作用 DA 受体,导致神经毒性的发生^[7]。本实验从 TH 活性以及 DA 含量的水平,证实了 MA 对 DA 神经系统的损伤,并且此损伤在脑区内长期存在,各实验组 TH 与 DA 的含量均有不同程度的降低,且以 d7 组降低最为明显,这与王雪^[8]的报道一致,说明 MA 中毒,可导致 DA 神经系统毒性损伤,表现为 TH 活性降低,DA 含量下降。根据 MA 的毒理学作用并结合本实验五个脑区的 TH 阳性神经细胞、神经纤维以及 DA 递质含量变化的实验结果,推测上述脑区在脑内有可能形成一“神经网络结构”与 MA 的中毒 / 依赖作用直接相关,即 MA 中枢神经系统毒性作用的多靶点神经网络结构,此神经网络结构可能借助 DA 能神经系统或 DA 神经递质等进而诱发 MA 中毒的神经元、神经纤维的病理形态学改变。

MA 虽不能直接对神经元产生兴奋性毒性作用,但是 MA 可以通过促使 DA 的异常释放而增加 EAAs 浓度,这在 Faleiro、Mora^[9,10]等研究中得到了证实。Mora 等^[10]研究表明,给予大鼠 MA 能剂量依赖性的增加细胞外 Glu 和天门冬氨酸的浓度,上述作用能被 D1-4 受体阻断剂氟哌啶醇所阻断,进一步肯定了 DA 在 MA 诱导神经元的兴奋性毒性中的至关重要的作用。这也说明 MA 对神经元的兴奋性毒性作用需要 DA 的异常释放来诱导发生,即 DA 是 MA 引起 EAAs 的神经毒性作用的前体或媒介。另外,DA 神经细胞的兴奋性活动亦可由 EAAs 介导增强。因此,DA 与 EAAs 二者共同演绎、协调完成 MA 的中枢神经毒性作用。

总之,MA 中毒的诸多损伤机制中,MA 对多巴胺能神经系统的损伤是最为主要的,而其他损伤机制的提出与假设大多建立在多巴胺能神经系统损伤的基础之上。因此,应将 MA 损伤的重要靶点结构 - 多巴胺能神经系统作为 MA 毒性研究的基础和出发点。

参考文献 (References)

- [1] Volz T J, Hanson G R, Fleckenstein A E. The role of the plasma-mammalian dopamine and vesicular monoamine transporters in

methamphetamine-induced dopaminergic deficits [J]. J Neurochem, 2007,101(4):883-888

- [2] Thomas D M, Francescutti-Verbeem D M, Kuhn D M. The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. J Neurochem,2008,105 (3):605-616
- [3] Tata D A, Yamamoto B K. Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum [J]. Synapse,2008,62(5):325-336
- [4] Hozumi H, Asanuma M, Miyazaki I, et al. Protective effects of interferon- against methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. Toxicol Lett,2008,177(2):123-129
- [5] Zhang X, Dong F, Mayer G E, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 exacerbates methamphetamine-induced dopamine depletion in the striatum in rats [J]. Neuroscience,2007,150 (4): 950-958
- [6] Wu C W, Ping Y H, Yen J C, et al. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine-induced apoptosis [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2007,220(3):243-251
- [7] Zeng XF, Lu G, Li Z. Progress in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2010;25(1):33-36
- [8] Wang X, Kang L, Li SX, et al. Neurotoxicity and GFAP Expression of Methamphetamine [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences,2004;19(3):170-172
- [9] Faleiro LJ, Jones S, Kauer JA. Rapid synaptic synaptic plasticity of glutamatergic synapses on dopamine neurons in the ventral tegmental area in response to acute amphetamine injection [J]. Neuropsychopharmacology, 2004;29:2115-2125
- [10] Mora F, Porras A. Effects of amphetamine on the release of excitatory amino acid neurotransmitters in the basal ganglia of the conscious rat [J]. Can J Pharmacol,1993,71:348-351

(上接第 2241 页)

- [16] 王卓,姚婉贞,夏国光. 慢性阻塞性肺部疾病患者血清及痰中 β -防御素-2 水平及临床意义 [J]. 北京医学, 2008, 30(10): 577-581
Wang Zhuo; Yao Wan-zhen; Xia Guo-guang. The expression and significance of human β -defensin 2 in serum and induced sputum in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Beijing Medical Journal, 2008, 30(10): 577-581
- [17] 胡瑞成,谭双香,欧阳卿,等. 吸烟诱导慢性阻塞性肺疾病患者痰及肺组织 β -防御素-2 表达 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10(3): (已定稿)
Hu Rui-cheng, Tan Shuang-xiang, Ouyang Qin, et al. Expression of β -defensin-2 in sputum and lung tissue of chronic obstructive

pulmonary disease patients is Induced by smoking [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2011, 10(3): (finalized)

- [18] Chen L, Sun BB, Wang T, et al. Cigarette smoke enhances β -defensin 2 expression in rat airways via NF- κ B activation [J]. Eur Respir J, 2010, 36(3): 638-645
- [19] Shibata Y, Abe S, Inoue S, et al. Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs [J]. Respiriology, 2008, 13(7): 1061-1065
- [20] Janssens W, Nuytten H, Dupont LJ, et al. Genomic copy number determines functional expression of β -defensin 2 in airway epithelial cells and associates with COPD [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(2):163-169