

3-硝基丙酸的行为学效应和生化作用机制研究

(之三——小鼠亚急性毒性实验部分)

卫生部食品卫生监督检验所 研究生 胡 霞

指导导师 戴 寅 张均田* 罗雪云

摘要 测定了3-硝基丙酸(β NPA)的8周亚急性毒性,结果表明 β NPA可阻碍动物的生长发育,使肝/体比值降低。 β NPA能够促进动物的脑内神经递质多巴胺的合成,未发现明显的组织病理学损害。

关键词 3-硝基丙酸 亚急性毒性

肝/体比值 神经递质

1 材料(参见“之一”行为学部分)

1.1 试剂

去甲肾上腺素(NE),多巴胺(DA) 5-羟色胺(5-HT),5-羟吲哚醋酸(5-HIAA),3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC),二羟苯胺(DHBA)和高香草酸(HVA)均系Sigma和Merck厂产品。

1.2 仪器

日立高速冷冻离心机SCR20BA; Waters 6000A恒流泵; BASLC-4B电化学检测器; 玻碳电极; 0.46×25 cm PE色谱柱; 进样阀; Rheodyne; 水平电式记录仪; 横河北表电机3066型。

2 方法

选用出生后三周的断乳昆明种小鼠,体重8—10g,随机分为a、b、c、d四组,每组30—40只,雌雄约半。各组剂量为0(水对照组)、4、10、25 mg/kg。采用灌胃法给予小鼠 β NPA,准确控制给药量。每天灌胃一次,每周六次,尽量使每天给 β NPA的时间一致。实验期限为两个月(8周)。每周称体重一次,并观察记录一般健康状况、饲料消耗等。实验结束时测定了下列指标:

2.1 一般毒性: 体重增长、食物利用率和脏体系数。

2.2 行为测试: 自主活动量和跳台一避暗法测定学习记忆,方法同“之一”行为学部分,每组选取8只小鼠(雌雄各半),共32只。

2.3 生化指标: 小鼠大脑中RNA、DNA和蛋白质的测定: 实验期末各组随机选取10只小鼠,雌雄各半,共40只。断头后迅速取出全脑,去小脑称重(以上均为冷操作)后放入具塞离心管内按1:10加入冰冻生理盐水,用匀浆器快速打匀,取10%脑匀浆1 ml按FolCh^[1]法提取后,上清液按苔黑酚法(Orcinol法)^[2]测RNA含量,按二苯胺法^[2]测DNA,沉淀则按Lowry法^[3]测蛋白质。

2.4 神经递质的测定^[4]: 实验期末各组随机选取7只雄性小鼠,共28只。采用HPLC法测定小鼠大脑中六种单胺类神经递质及其代谢产物的含量。即将小鼠断头后迅速取出全脑,去小脑后称重,立即置于乳钵中同时加入2 μ l/ml DHBA 50 μ l,冷0.1 mmol/l HClO₄ 1 ml磨成匀浆(以上均为冷操作),然后倒入离心管中于4 $^{\circ}$ C, 45000g离心20 min,取上清液20 μ l直接进样。结果计算: 本

法为内标法测定,各样品的峰值均与内标峰值相比得峰比值,然后依下式计算:

$$\frac{\text{标准品含量} \times \text{样品峰比值} \times 50}{\text{标准品峰比值} \times \text{脑重}} = \text{含量/单}$$

位脑重

2.5 组织病理学检查:实验期末各剂量组取10只小鼠(雌雄各半),每只动物取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、大脑、睾丸(或卵巢)等脏器进行光镜检查。各剂量组取2只小鼠处死后,迅速取大脑纹状体部位,每例做5个包埋块,经超薄切片染色后,在H-800TEM电镜下观察其超微结构。

3 结果与讨论

3.1 一般毒性

3.1.1 动物体重,见图1

经统计学检验,雌性小鼠体重c组在第4、5、6周时降低($P < 0.05$),d组在第7周时降低明显($P < 0.01$),b组在第8周时才开始降低($P < 0.05$)。雄性小鼠以b组降低为多(4、5、6周)($P < 0.05$),而在第7周时,c和d组开始降低($P < 0.05$)。

3.1.2 食物利用率

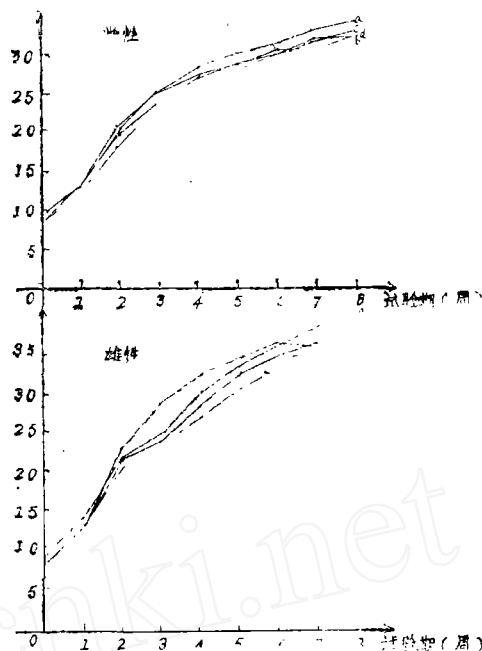


图1 实验期内各组小鼠的体重改变
a为水对照组 b~d不同剂量组

以实验动物每吃入100g饲料所增长的体重克数表示,结果如下:

表1 实验期内各组小鼠的食物利用率

组别	剂量 mg/kg	食物利用率							
		1周	2周	3周	4周	5周	6周	7周	8周
a	0	28.03	24.59	9.74	11.27	5.55	4.59	4.29	1.88
b	4	27.79	26.90	10.98	8.37	5.64	5.08	6.31	0.27
c	10	25.58	26.40	10.96	10.29	7.64	4.65	4.35	0.16
d	25	27.32	26.75	12.70	9.72	4.95	4.03	-0.98	5.83

注:负号表示体重降低

3.1.3 脏体系数:实验结束时,测得各脏体系数如下:

表2 BNP A给药8周时各组小鼠的脏体系数

组别	剂量 (mg/kg)	脏/体比值(每100克体重的各脏器湿重(g))				
		心	肝	脾	肺	肾(单侧)
a	0	0.435 ± 0.041	5.005 ± 0.5	0.409 ± 0.074	0.805 ± 0.18	0.690 ± 0.162
b	4	0.414 ± 0.032	4.809 ± 0.4	0.430 ± 0.087	0.726 ± 0.08	0.691 ± 0.105
c	10	0.428 ± 0.026	4.342 ± 0.5* ↓	0.372 ± 0.096	0.835 ± 0.17	0.693 ± 0.108
d	25	0.439 ± 0.022	4.365 ± 0.4** ↓	0.348 ± 0.049	0.977 ± 0.13* ↓	0.706 ± 0.107

由表2可见,肝/体比值明显降低,这可能是肝脏功能遭受破坏所致。而最高剂量组的肺/体比值增加,则可能是 β NPA引起肺充血的结果。

3.2 行为学指标

3.2.1 实验期末,每组选8只(雌雄各半)

小鼠进行活动量测定,结果见表3:

由表3可见,各组间的自主活动量无统

表3 β NPA给药8周时各组小鼠的自主活动量

组别	剂量(mg/kg)	活动量(10min)
a	0	303.63 ± 183.5
b	4	192.75 ± 93.18
c	10	285.63 ± 114.48
d	25	208.0 ± 146.61

计学差异。

3.2.2 跳台——避暗实验结果见表4:

表4 β NPA给药8周时各组小鼠的跳台——避暗实验结果

组别	剂量(mg/kg)	训练时		重测时(24h后)			
		跳台电击数	避暗潜伏期(sec)	跳台潜伏期(sec)	跳台电击数	避暗潜伏期(sec)	避暗电击数
a	0	3.2 ± 1.7	14.0 ± 6.02	126.2 ± 70.7	0.9 ± 1.3	184.6 ± 120.96	0.8 ± 0.63
b	4	2.5 ± 1.2	58.4 ± 88.8	171.0 ± 28.5	0.1 ± 0.3	225.6 ± 92.5	0.5 ± 0.53
c	10	2.9 ± 2.5	27.2 ± 24.4	155.5 ± 56.1	0.4 ± 0.7	193.9 ± 125.4	0.8 ± 1.03
d	25	2.6 ± 1.96	130.7 ± 115.9*	158.8 ± 55.8	0.2 ± 0.4	196.8 ± 120.2	0.9 ± 1.10

由上表可见,除最高剂量组在训练时避暗潜伏期明显延长外,其余指标均无统计学差异。

3.3 生化指标

表5 β NPA给药8周时各组小鼠大脑中DNA、RNA和蛋白质含量

组别	剂量(mg/kg)	DNA(mg/g)	RNA(mg/g)	蛋白质(mg/g)
a	0	1.753 ± 0.65	1.559 ± 0.52	90.50 ± 3.45
b	4	1.789 ± 0.7	1.607 ± 0.45	95.95 ± 6.64
c	10	1.706 ± 0.55	1.580 ± 0.47	92.36 ± 5.27
d	25	1.713 ± 0.67	1.476 ± 0.49	89.86 ± 5.73

由表5可见,各组间的差异均无统计学意义。

3.4 神经递质的测定:

表6 给 β NPA 8周时各组小鼠大脑中单胺类神经递质的含量

组别	剂量(mg/kg)	去甲肾上腺素 NE (ng/g)	多巴胺 DA (ug/g)	3,4-二羟基苯乙酸 DOPAC (ng/g)	高香草酸 HVA (ng/g)	5-羟色胺 5-HT (ug/g)	5-羟吲哚醋酸 5-HIAA (ug/g)
a	0	806.64 ± 92.01	4.16 ± 0.23	386.26 ± 35.03	350.97 ± 27.99	1.666 ± 0.244	1.54 ± 0.17
b	4	789.33 ± 92.09	4.65 ± 0.42* ↑	433.91 ± 78.52	392.31 ± 50.65	1.616 ± 0.065	1.68 ± 0.15
c	10	789.59 ± 43.03	4.25 ± 0.49	410.86 ± 86.08	356.00 ± 32.46	1.577 ± 0.099	1.49 ± 0.09
d	25	787.99 ± 80.14	4.48 ± 0.51	405.49 ± 43.20	406.47 ± 44.5* ↑	1.56 ± 0.11	1.59 ± 0.15

由表6看出,多巴胺含量在低剂量4 mg/kg组有增高($P < 0.05$),而其代谢产物高香草酸则在最高剂量25mg/kg组有明显升

实验结束时,每组取10只小鼠,雌雄各半,测定了大脑中RNA、DNA及蛋白质的含量:

实验期末,每组选取七只雄性小鼠,用HPLC法测定大脑内六种递质的含量,结果见表6:

高($P < 0.05$)。由此可见, β NPA对脑中单胺类递质无明显影响。

3.5 组织病理学检查:

3.5.1 光镜：多数动物肝脏均可见小灶性炎症细胞浸润及点状坏死，此种改变程度在对照组与实验组之间无明显差异。其他各脏器均未见明显病变。

3.5.2 电镜：各组动物的脑纹状体部位可见该处神经细胞、各种胶质细胞及毛细血管内皮细胞的超微结构基本正常，未见明显病理改变。

全文讨论如下

1. 本研究观察到 β NPA对幼年小鼠的急性毒性较成年鼠强，对大鼠的作用较小鼠强，这与刘兴玠等用产毒节菱孢培养物所测的毒性结果一致，中毒症状也与用粗提物所测一致^[5]。 β NPA在中枢神经系统的作用部位是基底神经节或锥体外系，Hamilton等人的组织病理学结果也证实了这一点^[6]。

2 本研究结果发现 β NPA能损伤动物的运动协调功能，但不影响其学习记忆等大脑的意识活动，这一点也与变质甘蔗中毒病人的临床表现相一致，从而可以基本排除 β NPA对动物大脑高级功能及其结构的损害作用。Hamilton等人未发现 β NPA中毒大鼠的大脑和小脑皮层有形态学损害，也可以作为本结果的佐证。^[6]

3. 本研究发现 β NPA能引起动物体内、外的脂质过氧化，损伤细胞膜的结构和功能，并且改变抗氧酶的活性，这可能是 β NPA致动物运动神经细胞中毒的生化基础。对此，国内、外尚未见有报道。体外实验结果表明，低浓度的 β NPA能诱发MDA生成，而高浓度时却出现了抑制作用，这可能是由于高浓度 β NPA使细胞中毒，供氧减少，致使 O_2^- 和MDA产生减少所致。但是，体内实验结果却无类似体外实验的浓度—效应关系； β NPA对体内MDA产生的影响以升高为主，可以推断其在体内还是以诱发脂质过氧化作用为主。另一方面，本实验观察到VE、人参皂甙Rb₁有对抗 β NPA诱发的

MDA产生的保护作用，可以考虑用于人类霉变甘蔗中毒的治疗手段之一。 β NPA可使脑细胞浆内GSH—P_x活性增高，可能反映了机体对于 β NPA引起脂质过氧化毒性的一种适应性改变。 β NPA能引起大脑内单胺类神经递质多巴胺和高香草酸含量的增加，根据多巴胺的代谢方式，^[7]可以认为 β NPA能够促进多巴胺的合成，而不是抑制其降解。

4. 亚急性毒性实验为期八周，小鼠每天灌胃一次，每周六次，未观察到有意义的组织病理学结果，这提示我们： β NPA对于小鼠的毒性并不大，这一点从其LD₅₀值也可以看出。而人类对 β NPA极其敏感，只吃一次霉变甘蔗就能引起严重的不可逆的毒性作用，^[1]因此在人类与啮齿类动物之间存在着较大的种属差异性，小鼠对 β NPA的不敏感，可能是种间差异的表现。今后应尽可能用生物学特性与人接近的或对 β NPA更敏感的动物来研究 β NPA的毒性。

5. 建议今后应进一步研究有关 β NPA的代谢分布、对能量代谢的影响、生化作用机制以及霉变甘蔗中毒的预防措施等方面的课题。

参 考 文 献

- [1] Folch J M, et al. J. Bio. Chem. 1957, 226:497.
- [2] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常见化学分析法. 北京, 科学出版社, 1982, 93—121.
- [3] Lowry OH, et al. J. Biol. Chem. 1951, 193:265.
- [4] 屈志炜, 等. 用高效液相色谱电化学检测器测定小鼠脑内单胺类物质的研究. 中国医学科学院学报 1987, 9(5):371.
- [5] 刘兴玠, 等. 产毒节菱孢培养物对动物的毒性研究. 卫生研究 1987, 16(5):26.
- [6] Hamilton B F, et al. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitro-Propionic acid, a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. Acta Neuropathol 1987, 72(3): 286
- [7] 邹冈. 基础神经药理学. 北京, 科学出版社, 1988, 162.