

甲氰菊酯联合多巴胺对小鼠多巴胺能神经通路的影响

熊婧 胡丹 张振涛 张兆辉

【摘要】 目的 观察甲氰菊酯(Fenpropathrin, Fen)单独腹腔注射及与多巴胺(Dopamine, DA)立体定向注射联合使用对 C57BL 小鼠黑质纹状体多巴胺能神经通路的影响。**方法** 分别采用 Fen 腹腔注射、DA 立体定向注射至纹状体及 DA 预处理联合 Fen 注射建立 C57BL 小鼠模型,观察小鼠行为学变化,HPLC 检测脑组织内 Fen 的含量;激光共聚焦显微镜观察小鼠的黑质多巴胺能神经元及纹状体的 TH 染色。**结果** Fen 及 DA 分别单独使用及 DA 预处理联合 Fen 注射均造成小鼠自主活动能力减少,HPLC 检测显示小鼠脑组织中 Fen 的浓度与腹腔 Fen 给药浓度成正比,TH 染色发现 Fen 连续使用 7 d 和 DA 立体定向注射后第 7 d 的小鼠黑质均出现神经元中 TH 表达不均一,并且纹状体出现斑片状的 TH 染色丢失,其中 DA 预处理后使用 Fen 注射 7 d 组改变最明显。**结论** Fen 能够透过小鼠血脑屏障,可以直接作用于小鼠黑质纹状体多巴胺能系统,并且可以明显增强 DA 对黑质纹状体的损伤作用。

【关键词】 甲氰菊酯 帕金森病 多巴胺 酪氨酸羟化酶

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0393-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.003

The toxic effect of fenpropathrin and dopamine on dopaminergic system of mice Xiong Jing, Hu Dan, Zhang Zhentao, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To explore and compare the effects of fenpropathrin intraperitoneal injection or combined with DA stereotactical injection on dopamine system of mice. **Methods** Fenpropathrin was injected intraperitoneally or combined with the DA stereotactically injected at the striatum of the mouse brain. The behaviors features of animals were investigated using pole jumping test and head up test. HPLC was used to detect the fenpropathrin in the mice brain after fenpropathrin intraperitoneal injection. The immunoreactivity of tyrosine hydroxylase in the brains were observed by immunohistochemistry. **Results** Behavior investigation indicated that both fenpropathrin intraperitoneal injection or combined with the DA stereotactically injection could decrease the mice's activity. Fenpropathrin was detected in the brain by HPLC. Immunohistochemistry study suggested that the tyrosine hydroxylase immunoreactivity were decreased in striatum of fenpropathrin combined with the DA group. DAT immunoreactivity were increased in the striatum after fenpropathrin exposure. **Conclusion** Fenpropathrin could cross the blood brain barrier, enhanced the toxicity of DA on dopamine system.

【Key words】 Fenpropathrin Parkinson's disease Dopamine Tyrosine hydroxylase

甲氰菊酯(Fenpropathrin, Fen)是一种常用的拟除虫菊酯类农药,具有高效能、杀虫谱广、低残留等特点,近年来被广泛应用于家庭防蚊和农业除虫。Fen 对高等动物的毒性中等,但在鱼类等水产生物中毒性可以蓄积,由于其在环境中半衰期

较长,在河塘底泥中不易降解,因此 Fen 在我国已被禁用于水产业,然而仍有一些渔民将 Fen 用于池塘毒鱼。我们曾收治了 1 例 42 岁的帕金森病(Parkinson's disease, PD)患者,该患者曾在发病前约 1 年有间断捡食鱼塘中 Fen 毒杀的濒死的鱼,该过程长达半年之久,后来逐渐表现出 PD 样症状。根据该患者独特的既往史,我们推测 Fen 很可能与其发病有关。前期研究发现 Fen 可以在体外模型中模拟 PD 的部分发病机制及病理学特点^[1],本

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(项目编号为 81501107)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内一科[熊婧 胡丹 张振涛 张兆辉(通信作者)]

研究将进一步观察 Fen 对 C57BL 小鼠行为学及黑质纹状体多巴胺能神经通路的影响,以探明 Fen 与 PD 发病的相关性,为寻找 PD 新的病因提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要的仪器与试剂

甲氰菊酯(Fenpropathrin, Fen)购于浙江省东阳市金鑫化学工业公司,纯度为 92%;DA 为盐酸多巴胺注射液,20 mg/2 mL,购自广州白云山明兴药业;兔抗酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体购自美国 Abcam 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔荧光二抗、Hoechst 33258 染料购自 ProteinTech Group 公司;高效液相色谱仪(Agilent 120, 美国),激光共聚焦显微镜(Zeiss 公司, 德国),大鼠脑立体定向仪购自瑞沃德生命科技有限公司;实验动物为健康雄性 C57BL/6 小鼠,体重 18-22 克,购自武汉大学动物实验中心。

1.2 实验分组与给药

本实验共分为 7 组,随机分为对照组、Fen 1 d 组, Fen 7 d 组, DA 立体定向注射后 2 d 组, DA 预处理 + Fen 1 d 组, DA 立体定向注射后 8 d 组和 DA 预处理 + Fen 7 d 组。Fen 给药方式为每日定时腹腔注射给药,给药剂量为 $47.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (0.2 LD₅₀);DA 给药方式为立体定向注射,剂量为 20 μg ,注射部位为小鼠右侧纹状体;DA 预处理 + Fen 组为 DA 立体定向注射 24 h 后开始给予 Fen 腹腔注射。

1.3 HPLC 检测脑组织中 Fen 含量

检测 Fen $47.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (0.2 LD₅₀) 1 d 组和 Fen $95.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (0.4 LD₅₀) 1 d 组中脑组织中 Fen 含量。小鼠于给药后 24 h 断头取脑、称重,并加入丙酮充分匀浆,随后加入石油醚、2%硫酸钠水溶液提取,之后干燥、吹干、净化后使用 Agilent 1260 检测仪检测,检测仪器类型为紫外 (205 nm),色谱柱为 Hypersil 4.6 \times 200 mm (5 μm),柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$,流动相为 85%甲醇 + 15%水,流量为 1 mL/min,检测室温为 17 $^{\circ}\text{C}$ 。计算方法:外标法定量,保留时间定性。当标准品与样品进样体积相同时,计算公式为 $R = (C \times V) / W$, R 为组织中 Fen 含量 ($\mu\text{g/g}$), C 为样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), W 为标本重量 (g)。

1.4 小鼠体重及行为学检测

小鼠于给药前及给药后每日相同时间测量体重,行为学检测包括小鼠总体行为学观察、爬杆实验及直立实验。爬杆实验:将小鼠放置于一根垂直于地面的长 50 cm,粗 1 cm 的木杆顶上,其中杆顶固定有一个泡沫塑料小球,将小鼠双后肢置于球上,呈尾部向上、头部向下的姿势,让其爬下,然后记录小鼠从杆顶向下爬至两侧前肢均触及木杆底部平台的时间,如小鼠 3 min 内未爬下,时间记录为最长时间 180 s。直立实验:将小鼠放入一个 30 cm \times 30 cm \times 15 cm 的有机玻璃盒,安静环境下让小鼠适应 10 min,随后记录小鼠 5 min 内自发站立的次数,分别记录 5 次,计算均值。

1.5 免疫荧光染色观察 TH 表达水平

用 10%苯巴比妥钠麻醉小鼠后 4%的多聚甲醛灌注固定,断头取脑后脑组织置于 4%多聚甲醛中固定,随后使用蔗糖梯度脱水沉底,标本速冻后切片。冰冻切片使用 0.1% Triton 破膜,10%BSA 室温封闭 2 h,再滴加 TH (1:500) 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,常温下复温 30 min,滴加相应 FITC 标记的羊抗兔抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, Hoechst 33258 室温染色,随后封片、固定,激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组数据间的显著性分析用 t 检验,多组数据间的比较采用单因素方差分析 (ANONA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HPLC 检测到小鼠脑组织中有 Fen 残留

HPLC 检测发现 Fen 47.8 mg/kg 和 Fen 95.6 mg/kg 腹腔注射 24 h 后小鼠脑组织中均有 Fen 残留,残留量分别为 0.97 μg 和 1.63 μg ,残留量与注射量成正比。

2.2 小鼠体重改变

Fen 腹腔注射 1 d 及 7 d 组小鼠均未出现异常行为学变化,注射后小鼠摄食减少,体重进行性减轻,在前 3 d 明显,后来体重缓慢增加,与对照组体重增长速度比较有明显差异 ($P < 0.05$)。DA 立体定向组,小鼠第 2 d 体重一过性下降,第 3 d 开始增长正常,与对照组比较无明显差异,而 Fen + DA 共同作用 7 d 组小鼠体重进行性下降,约到第 4 d 出现体重稳定,此后缓慢增长,体重增长速度与对照组比较,有明显差异 ($P < 0.05$) (图 1)。

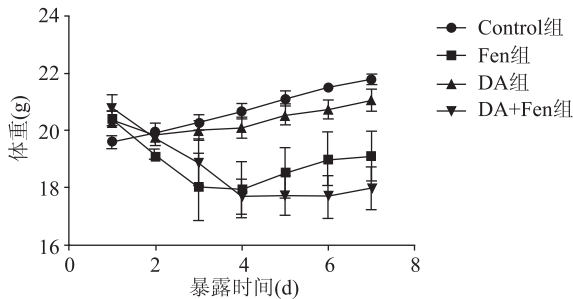


图 1 不同药物处理后小鼠体重的变化

2.3 小鼠行为学改变

爬竿实验中 Fen 7 d 组,DA 立体定向注射后 8 d 组及 DA 预处理 + Fen 7 d 组爬竿时间均延长,与对照组比较有明显差异($P<0.05$)(图 2),但是在爬杆实验过程中药物注射组的小鼠缺乏下杆的动作及部分小鼠停留在杆顶,从而检测时间异常延长。在直立实验中 Fen 7 d 组及 DA 预处理 + Fen 7 d 组 5 min 内直立次数分别减少至对照组的 38.34% 和 32.33%,与对照组比较有明显差异($P<0.05$)(图 2)。

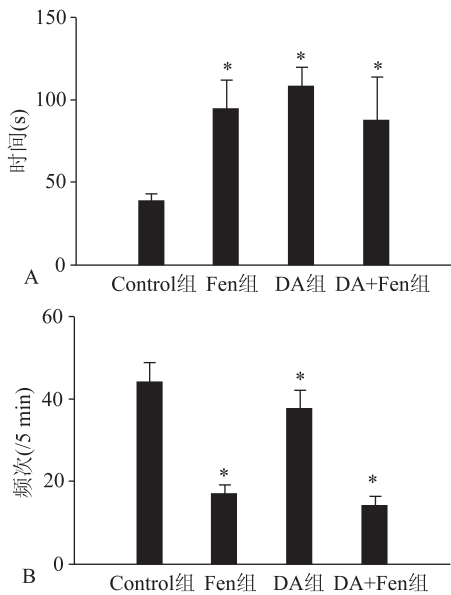


图 2 小鼠行为学变化 A 为爬竿实验;B 为直立实验;Control 组为对照组;Fen 组为 Fen 7 d 组;DA 组为 DA 立体定向注射后 8 d 组;Fen + DA 组为 DA 预处理 + Fen7 d 组。与 Control 组比较, * $P<0.05$

2.4 小鼠黑质 TH 染色

对照组小鼠黑质神经元中 TH 染色均匀分布于胞浆及突起中,神经元胞体饱满,突起染色明显(图 3),Fen 1 d 组(图 3)、DA 立体定向注射 2 d 组(图 3)及 DA 预处理 + Fen1 d 组(图 3)TH 染色显

示黑质神经元 TH 分布均一,细胞形态改变不大,与对照组比较无明显差异,而 Fen7 d 组(图 3)、DA 注射后 8 d 组(图 3)及 DA 预处理 + Fen7 d 组(图 3)TH 染色显示黑质神经元胞浆 TH 染色不均匀,形态欠饱满,尤其是在 DA 预处理 + Fen7 d 组小鼠黑质 TH 染色阳性细胞较对照组明显变少,并且细胞中 TH 染色不均。

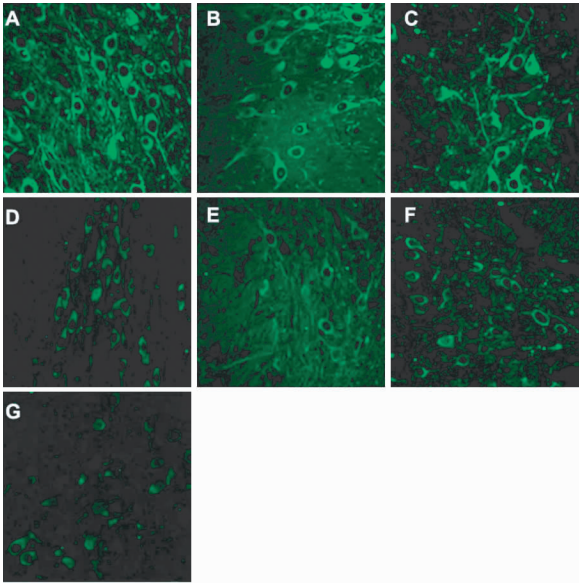


图 3 黑质神经元 TH 染色($\times 20$ 倍) A 为对照组;B 为 Fen1 d 组;C 为 DA 立体定向注射后 2 d 组;D 为 DA 预处理 + Fen1 d 组;E 为 Fen 7 d 组;F 为 DA 立体定向注射后 8 d 组;G 为 DA 预处理 + Fen7 d 组

2.5 小鼠纹状体 TH 染色

对照组小鼠纹状体 TH 染色较均一(图 4),然而 DA 立体定向注射后 2 d 组 TH 染色显示纹状体中存在斑片状 TH 染色缺失(图 4),并且 DA 预处理 + Fen 1 d 组(图 4),Fen 7 d 组(图 4),DA 立体定向注射后 8 d 组(图 4)及 DA 预处理 + Fen7 d 组(图 4)纹状体 TH 染色的荧光强度较对照组均减弱。

3 讨论

PD 病因不明,目前认为散发型 PD 是遗传因素、年龄老化以及环境毒素等多因素共同作用的结果。农药是一种常见的环境毒素,在生产生活中广泛应用,与 PD 发病的关联性已在部分农药中得到证实^[2-3]。Fen 作为一种上个世纪中期才研发出来的一种新型的拟除虫菊酯类农药,它与 PD 的相关性研究尚很少。本课题组在前期研究中发现 Fen

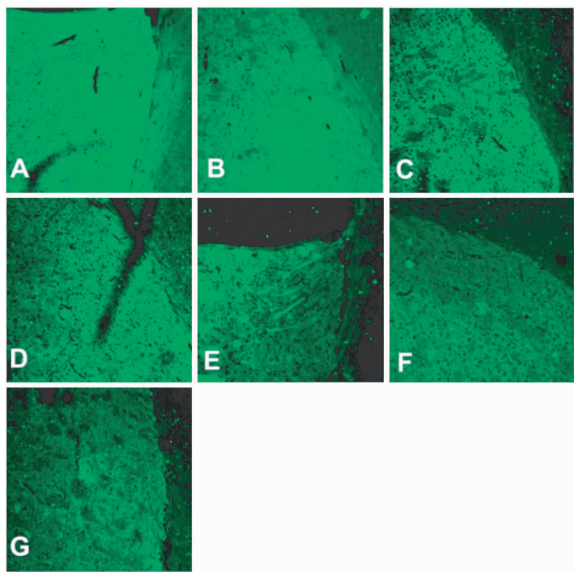


图4 纹状体 TH 染色($\times 10$ 倍) A 为对照组;B 为 Fen1 d 组;C 为 DA 立体定向注射后 2 d 组;D 为 DA 预处理 + Fen1 d 组;E 为 Fen 7 d 组;F 为 DA 立体定向注射后 8 d 组;G 为 DA 预处理 + Fen7 d 组

在体外模型中可以模拟 PD 的部分发病机制及病理学改变^[1],而体内环境是多种因素共同作用的结果,远比单一的体外环境复杂,因此本研究进一步探讨 Fen 单独及联合高 DA 水平对小鼠黑质纹状体系统的作用。

血脑屏障是机体中枢神经系统的特殊结构,可以阻止外周血液中的有害物质进入颅内,是中枢神经系统的特殊防御结构。本研究使用 HPLC 检测腹腔注射 Fen 的小鼠脑组织中 Fen 的含量,证实 Fen 可以透过血脑屏障,直接作用于中枢神经系统,且颅内 Fen 的浓度与外周 Fen 给药浓度呈正比。Fen 等拟除虫菊酯类农药不溶于水或难溶于水,但可溶于有机溶剂,具有很强的脂溶性,可经消化道、呼吸道及皮肤黏膜进入人体,可以改变细胞表面各种离子通道的电位,影响各种细胞功能,有研究发现氯氰菊酯^[4]和溴氰菊酯^[5]等农药可以透过血脑屏障,干扰中枢神经系统功能,尤其长期氯氰菊酯暴露可以减少大鼠黑质纹状体系统中 DA 的含量,造成多巴胺能神经元死亡^[6]。预实验中我们观察 DA 预处理后的小鼠在 24 h 后加用 Fen $95.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射时小鼠很快出现抽动,随后死亡,考虑 2 个药物连用明显增加了对小鼠的毒性作用,因此后续试验中使用 Fen $47.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 为 Fen 腹腔注射浓度。

帕金森病典型的病理改变是黑质多巴胺能神经元的进行性丢失和路易小体的形成。黑质纹状体多巴胺能神经通路相对于别的脑区还有更高浓度的 DA 水平。DA 作为一种内源性神经递质,在 PD 及某些神经精神疾病中发挥重要作用,然而 DA 也是一种内源性神经毒素,它能够诱导神经细胞内生成活性氧(ROS),加重氧化应激反应,并可以诱导蛋白质构象异常^[7],选择性增加 DA 能神经细胞死亡^[8]。本研究通过立体定向注射 DA 到小鼠纹状体,增加黑质纹状体 DA 含量,观察 Fen 与 DA 分别作用及 DA 预处理后联合 Fen 使用对黑质纹状体的影响,结果显示 DA 预处理 + Fen7 d 组的小鼠与单独 Fen 7 d 组的小鼠比较,体重持续下降,且不可恢复,而 DA 立体定向组只有短暂的体重下降,并且行为学检测发现 Fen7 d 组和 DA 预处理 + Fen7 d 组小鼠的自由活动能力明显低于对照组,并且 DA 预处理 + Fen7 d 组低于 Fen7 d 组,而 DA 单独使用组无明显异常。Fen7 d 组小鼠的黑质神经元中 TH 染色没有明显的改变,而 DA 8 d 组和 DA 预处理 + Fen7 d 组均看到黑质神经元胞浆和纹状体 TH 染色减弱,并且 DA 预处理 + Fen7 d 组中 TH 染色较对照组改变最明显。这提示 Fen 对动物存在毒性作用,与 DA 联合使用时可以加重 DA 对黑质神经元的损伤。

Fen 诱导黑质多巴胺能神经元损伤的机制未明。一方面 Fen 可以降解为氰化物和醛,氰化物可以干扰线粒体呼吸链,加重细胞氧化应激损伤。有研究发现拟除虫菊酯类农药能够抑制动物线粒体呼吸链复合体 I 的活性^[9]及细胞色素 C 氧化酶的活性,从而增加 ROS 的生成和线粒体损伤。在富含 DA 的黑质纹状体系统中氧化应激反应尤为明显,DA 可以氧化 NADH,加重线粒体损伤,增加活性氧释放,参与 PD 的发病^[7],由此本研究推测氧化应激反应在 Fen 诱导的神经细胞损伤中有重要作用。在溴氰菊酯^[10]及氯氰菊酯^[11]的大鼠模型中均证实该类农药可以增加神经系统脂质过氧化水平,增加氧化应激反应;另一方面 Fen 可以作用于昆虫或动物细胞膜上的钠离子通道,增加 Na^+ 内流,从而延长钠离子通道开放的时间^[12]。多巴胺转运体(Dopamine transporter, DAT)是多巴胺能细胞表面的重要蛋白,它可以将突触间隙的 DA 再摄取至细胞内,它受 Na^+/Cl^- 离子依赖型转运蛋白基因家族编

码^[13],因此 Fen 可能作用于 DAT 蛋白,增加 DA 的再摄取,加重多巴胺能神经元内 DA 的毒性反应,从而使 Fen 与 DA 联用的黑质纹状体系统的损伤尤为明显。

综上所述,Fen 与 DA 联用可以增加 DA 对 DA 能神经通路的损伤,但具体机制还需进一步探讨。由于本研究采取的是 Fen 及 DA 急性短期作用模型,在研究中未检测到黑质多巴胺能神经元数目的明显减少及典型的 PD 样行为学改变,很多神经系统改变可能是对环境毒素的延迟反应,因此 Fen 对黑质多巴胺神经系统的长期毒性作用仍需进一步观察。

参 考 文 献

- [1] Xiong J,Zhang X,Huang J,et al. Fenpropathrin,a widely used pesticide,causes dopaminergic degeneration[J]. *Mol Neurobiol*,2016,53(2):995-1008.
- [2] Nandipati S,Litvan I. Environmental exposures and parkinson's disease[J]. *Int J Environ Res Public Health*,2016,13(9):881-900.
- [3] Tanner CM,Kamel F,Ross GW,et al. Rotenone,paraquat,and Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*,2011,119(6):866-872.
- [4] Singh AK,Tiwari MN,Upadhyay G,et al. Long term exposure to cypermethrin induces nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in adult rats;postnatal exposure enhances the susceptibility during adulthood[J]. *Neurobiol Aging*,2012,33(2):404-415.
- [5] Anadón A,Martinez-Larrañaga MR,Fernandez-Cruz ML,et al. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,1996,141(1):8-16.
- [6] Tiwari MN,Singh AK,Ahmad I,et al. Effects of cypermethrin on monoamine transporters,xenobiotic metabolizing enzymes and lipid peroxidation in the rat nigrostriatal system[J]. *Free Radic Res*,2010,44(12):1416-1424.
- [7] Bisaglia M,Soriano ME,Arduini I,et al. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione;implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease[J]. *Biochim Biophys Acta*,2010,1802(9):699-706.
- [8] Jeon SM,Cheon SM,Bae HR,et al. Selective susceptibility of human dopaminergic neural stem cells to dopamine-induced apoptosis[J]. *Exp Neurobiol*,2010,19(3):155-164.
- [9] Gassner B,W thrich A,Scholtysik G,et al. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,1997,281(2):855-860.
- [10] Tayebati SK,Di Tullio MA,Ricci A,et al. Influence of dermal exposure to the pyrethroid insecticide deltamethrin on rat brain microanatomy and cholinergic/dopaminergic neurochemistry [J]. *Brain Res*,2009,1301:180-188.
- [11] Giray B,Gürbay A,Hincal F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol[J]. *Toxicol Lett*,2001,118(3):139-146.
- [12] Cao Z,Shafer TJ,Crofton KM,et al. Additivity of pyrethroid actions on Sodium influx in cerebrocortical neurons in primary culture[J]. *Environ Health Perspect*,2011,119(9):1239-1246.
- [13] Pramod AB,Foster J,Carvelli L,et al. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics[J]. *Mol Aspects Med*,2013,34(2/3):197-219.

(2017-03-04 收稿)