

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0032-04

2, 4-二氯苯氧乙酸作用的鼠乳对幼鼠蓝斑核中多巴胺 β -羟化酶表达的影响*

李京¹, 毛庆花², 秦燕霞¹

(1. 山东省济宁医学院基础医学院, 山东 济宁 272067; 2. 山东省济宁市第一人民医院 新生儿科, 山东 济宁 272000)

摘要: 目的 观察经腹腔注射除草剂 2, 4-二氯苯氧乙酸 (简称 2, 4-D) 的鼠乳, 对幼鼠蓝斑核中多巴胺 β -羟化酶 (DBH) 表达的变化, 探讨除草剂对神经系统发育的影响。**方法** 生后 7 d 且经母乳喂养的幼鼠 30 只, 分成实验组 1 (10 只)、实验组 2 (10 只) 及对照组 (10 只)。实验组 1、2 分别按照每天 70 及 100 mg/kg 剂量注射 2, 4-D 至母鼠腹腔 (二甲亚砜 0.1 ml 做溶剂); 对照组只进行正常鼠乳喂养。待幼鼠哺乳至第 22 天, 分别测量其体重、脑重; 取幼鼠的蓝斑核进行 DBH 免疫染色。**结果** ①至生后 22 d, 实验组 2 的幼鼠体重 (35.60 ± 2.84) g 与对照组比较 (47.21 ± 2.90) g 降低 26.8% ($P=0.000$); 而脑重分别为 (1.16 ± 0.05) 和 (1.33 ± 0.04) g, 实验组 2 降低 13.1% ($P=0.000$); ②实验组 1、2 幼鼠蓝斑核 DBH 相对光密度值为 (0.21 ± 0.03) 和 (0.19 ± 0.02), 低于对照组 (0.88 ± 0.38) ($P=0.000$)。**结论** 2, 4-D 能够抑制幼鼠体重增加; 降低幼鼠蓝斑核 DBH 的表达, 进而减少脑内去甲肾上腺素的合成, 抑制脑及神经系统发育。

关键词: 2, 4-二氯苯氧乙酸; 多巴胺 β -羟化酶; 蓝斑核; 幼鼠

中图分类号: R322.7

文献标识码: A

Effect of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid on expression of Dopamine beta hydroxylase in locus coeruleus of neonate rats*

Jing Li¹, Qing-hua Mao², Yan-xia Qin¹

(1. College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China; 2. Department of Neonatal Intensive Care Unit, Jining First People's Hospital, Jining, Shandong 272000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on expression of Dopamine beta hydroxylase (DBH) in the locus coeruleus (LC) rats. **Methods** A total of 307-days-old neonatal rats were randomly divided into 3 groups: group 1 in which maternal rats received 70 mg/kg/day of 2, 4-D for 14 consecutive days ($n=10$), group 2 in which maternal rats received 100 mg/kg/day of 2, 4-D for 14 consecutive days ($n=10$), and control group in which maternal rats did not receive any insults ($n=10$). All neonatal rats were breast feeding. Offsprings were sacrificed 22 days after birth and midbrains were harvested for immunohistochemistry staining. **Results** Rats in group 2 showed a significant reduction of body weight and brain weight when compared with control group (35.60 ± 2.84 g vs 47.21 ± 2.90 g, $P=0.000$, 1.16 ± 0.05 g vs 1.33 ± 0.04 g, $P=0.000$, respectively). Expression of DBH decreased significantly in group 1 and group 2 when compared with control group (0.21 ± 0.03 vs 0.88 ± 0.38 , 0.19 ± 0.02 vs 0.88 ± 0.38 , $P=0.000$, respectively). **Conclusion** 2,4-D inhibits the activity of DBH, leading to the decrease of Noradrenaline in the LC of the pups and damage to the nervous system.

Keywords: 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid; Dopamine beta hydroxylase; locus coeruleus; neonate rat

收稿日期: 2017-03-10

* 基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (No: 2016WS0161); 2015 年济宁医学院科研计划项目 (No: JY2015KJ009)

在现代社会, 越来越多的环境污染物严重威胁人类的健康。研究显示^[1], 如果女性处于化学污染物不断增多的工作和生活环境下, 该女性体内的化学物质将不断积聚, 在其产后的乳汁中, 不仅能够检测出该化学物质, 还可能通过哺乳的方式进入新生儿体内, 导致新生儿自出生后便遭受污染物的损害^[1]。

在大鼠出生后的 2 周内, 中枢神经系统神经元的轴突及树突呈外向生长, 突触之间联系不断发生, 称为脑的急剧生长。在发育过程中, 中枢神经系统对外环境的敏感性不断加强; 当外界环境恶化时, 神经递质系统可能表现异常, 甚至引起不可逆性损害。多巴胺 β -羟化酶 (dopamine- β -hydroxylase, DBH) 是催化多巴胺 (dopamine) 合成去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA) 的标志酶^[2]。研究表明, 将含有除草剂 2, 4-二氯苯氧乙酸 (简称 2, 4-D) 的乳汁喂养乳鼠后, 发现其脑内多巴胺递质系统改变明显, 在黑质和中脑腹侧被盖区, 多巴胺神经元内酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的活性降低, 5-羟色胺神经纤维的密度减少, 并伴随行为活动改变^[2]。然而, 2, 4-D 对于脑内去甲肾上腺素递质系统的作用并不清楚。本研究将新生鼠置于 2, 4-D 暴露的环境中, 观察其蓝斑核 DBH 表达的变化情况, 并进一步阐述 2, 4-D 对神经系统发育的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 Wistar 鼠 30 只及其母鼠购于济宁医学院实验动物中心 (批文号: SCxK 晋 20080001), 兔抗鼠 DBH 单克隆抗体购于 Sigma 公司, 免疫组织化学 (简称免疫组化) 试剂盒购于北京中杉金桥公司, 2, 4-D (批号: 94-75-7) 购于青岛捷世康生物科技公司, 二甲亚砜 (DMSO 批号: 67-68-5) 购于南京化学试剂有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 将生后 1 d 的 30 只幼鼠分成 3 组, 每组 10 只, 并将相对应的母鼠置于同一饲养箱, 温度控制在 22 ~ 24℃, 保持饲养箱卫生、通风状况良好, 优质饮食喂养母鼠, 对幼鼠哺乳。自幼鼠生后第 8 天开始, 实验组 1: 向母鼠腹腔每天注射 2, 4-D 70 mg/kg+0.1 ml DMSO; 实验组 2: 2, 4-D 100 mg/kg+0.1 ml DMSO; 对照组: 母鼠对幼鼠进行哺乳; 直至生后第 21 天, 测量幼鼠的体重。第 22 天处死幼鼠,

测量脑重量; 取蓝斑区脑组织进行切片、备用。

1.2.2 免疫组化染色 采用试剂盒说明书的步骤, 即 ABC 法进行操作。

1.2.3 相对光密度值测定 采用图像分析软件检测蓝斑核 DBH 阳性区域的平均灰度值, 相对光密度 = $\text{Log} (256 / \text{平均灰度})$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

幼鼠生后第 22 天, 与对照组比较, 实验组 1 体重及脑重减少均不明显; 而实验组 2 体重与脑重减少, 均低于对照组和实验 1 组。见表 1。

与对照组比较, 两实验组幼鼠的蓝斑核 DBH 免疫反应降低 (见附图); 实验组 1 与实验组 2 DBH 相对光密度值比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.312$); 与对照组比较, 实验组 1 ($P = 0.000$)、实验组 2 ($P = 0.000$) DBH 相对光密度值均降低 (见表 2)。

表 1 生后第 22 天, 3 组幼鼠体重及脑重比较
($n = 10, \bar{x} \pm s$)

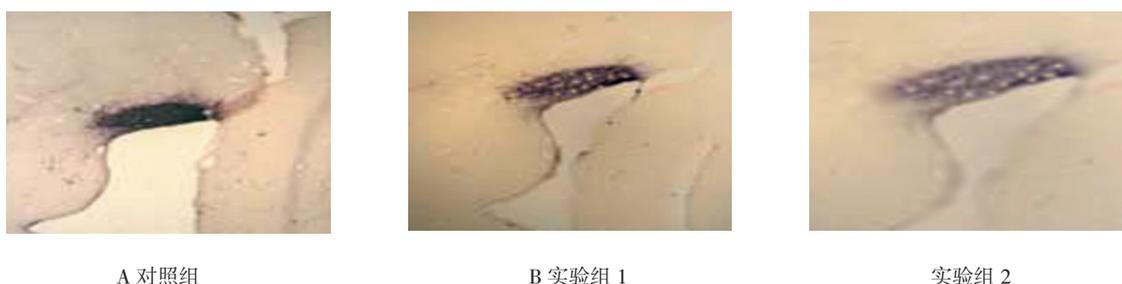
组别	体重/g	脑重/g
对照组	47.21 \pm 2.90	1.33 \pm 0.04
实验组 1	45.09 \pm 3.27	1.31 \pm 0.05
实验组 2	35.60 \pm 2.84 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.16 \pm 0.05 ⁽¹⁾⁽²⁾
F 值	42.180	37.863
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与实验组 1 比较, $P < 0.05$

表 2 生后第 22 天, 3 组幼鼠蓝斑核相对光密度值比较
($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	相对光密度值
对照组	0.88 \pm 0.38
实验组 1	0.21 \pm 0.03 [†]
实验组 2	0.19 \pm 0.02 [†]
F 值	615.622
P 值	0.000

注: \dagger 与对照组比较, $P < 0.05$



附图 幼鼠蓝斑核 DBH 表达 (×40)

3 讨论

既往于 DBH 的研究,主要集中在机体的应激状态下, DBH、NA 对于生理活动、运动的调节等方面。例如,在大鼠疼痛模型研究中^[3],发现脊髓的前角、外侧角内 DBH 阳性神经元数量增多, DBH 受到上游因子 AP-2 α 的调控, AP-2 α mRNA 水平增高, AP-2 α 蛋白合成升高,便引起 DBH 阳性产物增加;然而它没有对脑蓝斑区的 DBH 进行检测,脊髓内增加的 DBH,既可能是蓝斑区合成 DBH 增多进而转运到脊髓,也有可能是其他性质的神经元发生转化的结果。本实验从幼鼠摄入 2,4-D 慢性中毒的模型入手,发现实验组的幼鼠体重、脑重均随着中毒时间的延长而落后于对照组。说明 2,4-D 不仅严重影响脑的生长活动,也会引发全身各器官、系统的发育滞后。

除草剂是被广泛使用的化学制剂,在减少杂草、提高农作物产量方面起到重要作用;与此同时,也对土壤结构、土质造成一定损害。2,4-D 属于激素型除草剂,被叶片吸收后,转运至植物的分生组织,导致茎干卷曲、叶片萎蔫,造成植物的死亡,是一种高效内吸性除草剂^[4]。DMSO 是一种含硫有机化合物,对人体无毒,在研究中常常作为药物的溶剂,用来加快药物的吸收。本实验未设置单独注射 DMSO 的研究组,是因为 DMSO 没有神经系统毒性。

研究表明^[5],中缝背核内 5-羟色胺核团与蓝斑 NA 核团具有密切关联,从中缝背核至蓝斑核的纤维投射十分密集,该投射具有重要功能:如调节睡眠-觉醒状态,维持机体警觉,调整认知变化及应激反应等。当蓝斑核遭受毒性刺激时,中缝背核能够产生抑制性效应。中缝背核所含的 5-羟色胺神经元,通过其神经终末释放 5-羟色胺,调节蓝斑区 DBH 的浓度,控制 NA 的合成。

在 2,4-D 暴露下的幼鼠,STÜRTZ 等^[6]发现,中脑的 5-羟色胺神经元免疫活性增强,同时伴有其代谢

产物 5-羟吲哚乙酸的含量升高;而黑质内多巴胺能神经元 TH 免疫活性降低,也是受 5-羟色胺调节的结果^[7];说明机体受到毒物侵害时,5-羟色胺神经元通过自身或间接调节其他脑区神经递质的变化,将损害降至最小。本研究在 2 个实验组的蓝斑核,发现 DBH 的表达降低,2 个剂量组产生的效果相接近,提示当 2,4-D 使用剂量为 70 mg/kg 时,脑内部结构已经严重受损;可能此时的机体处于代偿状态,其体重、脑重并未无改变;随着 2,4-D 剂量的增加,不仅脑蓝斑区受损加剧,伴随各系统代偿失衡,甚至器官功能衰竭。最新的研究显示^[8],蓝斑核及其位于被盖网状核、内侧前额叶皮质、脊髓后角的神经纤维末梢,参与神经损伤后导致的触痛及痛觉过敏等症状。在损伤-康复过程中,蓝斑核先是发挥抑制疼痛的作用,而后又使得疼痛加剧^[9]。

综上所述,由于蓝斑区 TH 的水平受到 5-羟色胺的负性调节,即 5-羟色胺的浓度升高,TH 的合成会减少,导致络氨酸转化生成多巴胺的量降低,最终合成 NA 的含量也减少。另一方面,升高的 5-羟色胺通过纤维投射直接抑制 DBH 的活性,造成 NA 的合成减少。机体处在 NA 含量很低状态下,其健康受到严重威胁,甚至连正常的生理活动都无法完成。如果新生儿摄入含有 2,4-D 的乳汁或乳制品,必然危害其发育。因此,在农牧业领域,减少化学制剂的使用,不仅能够改善生态环境,更有利于提高农作物品质,促进健康发展。

参 考 文 献:

- [1] ARBUCKLE T E, BURNETT R, COLE D, et al. Predictors of herbicide exposure in farm applicators[J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2002, 75(6): 406-414.
- [2] GARCIA G, TAGLIAFERRO P, FERRI A, et al. Study of tyrosinehydroxylase-immunoreactive neurons in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid[J].

- Neurotoxicology, 2004, 25(6): 951-957.
- [3] 汪克建, 孙善全, 贺桂琼, 等. 福尔马林致痛大鼠脊髓去甲肾上腺素能神经元及其激活蛋白 2 α 的表达变化 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 658-662.
- [4] AMEL N, WAFA T, SAMIA D, et al. Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2, 4-Dichloro phenoxyacetic acid in rats[J]. J Food Sci Technol, 2016, 53(3): 1454-1464.
- [5] RUDYK C, LITTELJOHN D, SYED S, et al. Paraquat and psychological stressor interactions as pertain to Parkinsonian comorbidity[J]. Neurobiol Stress, 2015, 2(11): 85-93.
- [6] STÜRTZ N, DEIS R P, JAHN G A, et al. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on rat maternal behavior[J]. Toxicology, 2008, 247(2/3): 73-79.
- [7] IWANIR S, BROWN AS, NAGY S, et al. Serotonin promotes exploitation in complex environments by accelerating decision-making[J]. BMC Biol, 2016, 14(9): 1-15.
- [8] MARTINS IL, CARVALHO P, de VRIES MG, et al. Increased noradrenergic neurotransmission to a pain facilitatory area of the brain is implicated in facilitation of chronic pain[J]. Anesthesiology, 2015, 123(3): 642-653.
- [9] ZUBOVA Y O, BONDARENKO N S, SAPRONOVA A J, et al. Modeling of chronic selective inhibition of noradrenaline synthesis in the brain of neonatal rats[J]. Dokl Biochem Biophys, 2015, 461(1): 123-126.

(王荣兵 编辑)