· 实验研究 ·

2,5 – 己二酮对大鼠坐骨神经 P_0 和 NF 表达影响*

王哲敏[1], 关怀[2], 陈若霖[1], 戚媛[1], 朴丰源[1]

摘　要: 目的　观察 2,5 – 己二酮(2,5-HD)暴露对大鼠坐骨神经组织超微结构及 P_0(myelin protein zero)和神经丝(neurofilament, NF)表达影响,探讨它们之间的关联性。**方法**　成年雄性 SD 大鼠 40 只,随机分成对照组(生理盐水)和低、中、高剂量染毒组(100、200、400 mg/kg 腹腔注射 2,5-HD),每组 10 只,每周连续 5 d,1 次/d。染毒 5 周后处死动物,取坐骨神经,电镜观察形态学改变, RT-PCR 和 Western blot 检测 P_0、NF-L、NF-M 和 NF-H 基因和蛋白表达水平。**结果**　随染毒剂量升高,大鼠坐骨神经髓鞘形状渐不规则,并出现内折现象;轴索形状渐不规则,部分发生萎缩;神经丝数量渐少,排列稀疏。与对照组比较,400 mg/kg 2,5-HD 组大鼠坐骨神经 P_0 mRNA 表达量(0.75 ± 0.03)、NF-L、NF-M 和 NF-H mRNA 表达量[分别为(0.35 ± 0.07)、(0.25 ± 0.04)、(0.37 ± 0.05)]明显下降($P < 0.05$);与对照组比较,400 mg/kg 2,5-HD 组大鼠坐骨神经 P_0 蛋白表达量(0.79 ± 0.04)、NF-L、NF-M 和 NF-H 蛋白表达量[分别为(0.26 ± 0.02)、(0.12 ± 0.03)、(0.22 ± 0.02)]明显降低($P < 0.05$)。**结论**　亚慢性 2,5-HD 暴露导致的外周神经病变可能与 P_0 和 NF 表达异常有关,这些蛋白可能是 2,5-HD 攻击外周神经系统的靶点。

关键词: 2,5-己二酮(2,5-HD); 坐骨神经; 超微结构; 髓鞘蛋白 P_0; 神经丝(NF)
中图分类号: R 114　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)05-0584-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-05-12

Effects of subchronic 2,5-hexanedione exposure on expressions of myelin protein zero and neurofilament protein in rat sciatic nerve tissue

WANG Zhe-min*, GUAN Huai, CHEN Ruo-lin, et al (* *Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province* 116044, China)

Abstract: Objective　To explore the changes in ultrastructure and the expressions of myelin protein zero (P_0) and neurofilament protein (NF) in sciatic nerve tissue of rats subchronically exposed to 2,5-hexanedione (2,5-HD) and the relationship between the changes. **Methods**　Forty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (10 in each group) and treated with 2,5-HD saline solution at dose of 0, 100, 200, and 400 mg/kg by intraperitoneal injection for 5 days a week. After 5 weeks' treatment, the rats were executed and the sciatic nerve tissues were divided. Morphological changes in the tissues were observed with electron microscopy. Expressions of P_0, NF-L, NF-M and NF-H (for low, middle, and high molecular weight neurofilament protein) were analyzed with real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot. **Results**　With the increased exposure, the myelin sheath became irregular in shape and some of them enfolded; the axon also became irregular in shape and some of them appeared atrophy; while, the neurofilament decreased in number and arranged scattered. In 400 mg/kg 2,5-HD exposed group, the P_0 mRNA expression was 0.75 ± 0.03 and the NF-L, NF-M, and NF-H mRNA expressions decreased by 0.35 ± 0.07, 0.25 ± 0.04, and 0.37 ± 0.05, respectively, when compared with those of the control group ($P < 0.05$ for all). The protein expressions of P_0 was 0.79 ± 0.04, and the NF-L, NF-M, and NF-H protein expressions decreased by 0.26 ± 0.02, 0.12 ± 0.03, and 0.22 ± 0.02, respectively ($P < 0.05$ for all). **Conclusion**　P_0 and NFs may be involved in the peripheral nervous damage induced by 2,5-HD exposure and they may be the target molecules of the toxincant.

Key words: 2,5-hexanedione; sciatic nerve; ultrastructure; myelin protein zero; neurofilament

近年来,中国正己烷职业中毒报道较多[1-2],其代谢产物 2,5 – 己二酮(2,5-HD)是致神经毒性的终毒物[1]。慢性正己烷中毒患者组织病理学特征为轴索变性和脱髓鞘[3-4]。P_0(myelin protein zero)是外周神经髓鞘结构蛋白,对维持髓鞘结构稳定起重要作用。神经丝(neurofilament, NF)是神经元特异蛋白和细胞骨架成分,对轴突形态维持至关重要[5]。文献报道,2,5-HD 诱导神经组织 P_0 和 NF 表达异常[6-7]。因此,本研究拟通过观察 2,5-HD 暴露大鼠坐骨神经超微结构变化,检测坐骨神经组织 P_0 和 NF 表达水平,探讨其关联性。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　2,5-HD(美国 sigma 公司),纯度 ≥ 99%, RNAiso Plus、PrimeScript™ RT

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81273038)
作者单位: 1. 大连医科大学劳动卫生与环境卫生学教研室,辽宁 大连 116044; 2. 解放军第 210 医院
作者简介: 王哲敏(1988 –)女,内蒙古包头人,硕士在读,研究方向:神经毒理学。
通讯作者: 朴丰源, E-mail: piaofengyuan353@163.com
数字出版日期: 2015 – 4 – 9 15:41
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150409.1541.015.html

Master Mix、SYBR® Premix Ex Taq™ II(大连宝生物公司),RIPA 强裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、超敏化学发光试剂盒(上海碧云天公司),兔抗大鼠 P_0 抗体(武汉三鹰公司),小鼠抗大鼠 NF-L、NF-M 和 NF-H 抗体(美国 Cell Signal Technology 公司);小鼠抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司)。YD-1508 B 石蜡切片机(浙江省金华市益迪医疗设备厂),倒置相差荧光显微镜(日本 Olympus 公司),透射电镜 H-7500 型(日本日立公司),TP 800 Thermal Cycler Dice Real Time System(大连宝生物公司);UVP BioImaging System 凝胶成像分析系统(美国 Upland. CA 公司)。

1.2　动物分组与处理　健康成年雄性 SD 大鼠(大连医科大学实验动物中心)40 只,体重(200±15)g,许可证号:SCXK(辽)2008-0002。按体重随机分为对照组和低、中、高剂量染毒组,每组 10 只。对照组腹腔注射生理盐水,低、中、高剂量染毒组分别按 100、200 和 400 mg/kg 腹腔注射 2,5-HD,每周连续 5 d,1 次/d,连续染毒 5 周。

1.3　指标与方法

1.3.1　电镜样品制备与观察　每组随机取 2 只大鼠,麻醉、灌流、解剖、留取坐骨神经,迅速将坐骨神经切割成约 1 mm^3 大小组织块,2.0% 戊二醛固定,丙酮梯度脱水,Epon 812 包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,在 80 kV 电压下用 H-600 型透射电镜观察并摄片。

1.3.2　P_0、NF 基因表达测定　采用 RT-PCR 法,Trizol 法提取坐骨神经组织总 RNA,采用反转录试剂盒进行反转录,总反应体积 20 μL,42 ℃45 min 后反转录,85 ℃10 min 灭活反转录酶,-20℃ 保存或立即进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 3 min,95 ℃ 12 s,62 ℃ 40 s,40 个循环。P_0、NF-L、NF-M 和 NF-H 的引物序列如下:GAPDH 上游:5′-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3′,下游 5′-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3′;P_0 上游 5′-TCT CAG GTC ACG CTC TAT GTC TTT G-3′,下游 5′-CAG CCA GCA GTA CCG GAT CA-3′;NF-L 上游 5′-CAA GAT GGC ATT GGA CAT TGA GA-3′,下游 5′-CTA CCC ACG CTG GTG AAA CTG A-3′;NF-M 上游 5′-GAC ATC GAG ATC GCC GCA TA-3′,下游 5′-GTG TGT GTA CAG AGG CCC AGT GA-3′;NF-H 上游 5′-CAG AGT ACG CTG CAG TCA GAG G-3′,下游 5′-CTC TTG GGC AGA GCG CAT AG-3′。

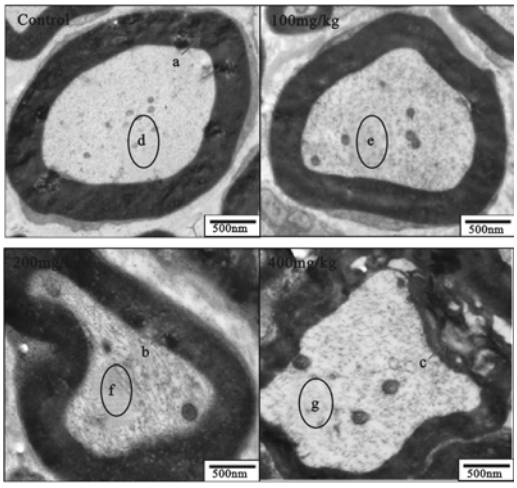
1.3.3　P_0、NF 蛋白表达检测　采用 Western blot 法,预冷组织蛋白抽提试剂,向其内加入 Roche 蛋白酶抑制剂及 PMSF,配制成裂解液,向各暴露组坐骨神经组织中加入裂解液,用眼科剪剪碎后在冰水混合物中用 Fluko 电动匀浆器 15 000 r/min 匀浆 30 s,在冰上孵育 20 min,4 ℃ 13 000 r/min 离心 20 min,取上清 BCA 法进行蛋白定量;取 100 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),120 V 电压下电泳 1.5 h,电泳结束后转膜,将胶上相应分子量的蛋白转移到硝酸纤维素膜上(P_0、NF-L 和 NF-M:60 V,2 h;NF-H:100 V,2h),5% 脱脂奶粉封闭4 ℃过夜,一抗孵育(P_0 为 1∶500;NF-L、NF-M、NF-H 为 1∶1 000;GAPDH 为 1∶400),二抗孵育,化学发光试剂盒检测,扫描胶片,凝胶图像处理系统分析。

1.4　统计分析　实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 差表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,用单因素方差分析(ANOVA)比较各染毒组与对照组间的统计学差异,两两比较采用最小显著差法,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　2,5-HD 对大鼠一般状况影响　对照组大鼠发育正常,毛色有光泽,行动迅速,步态无异常;低剂量 2,5-HD 组大鼠活动减少,后肢轻度外展;中剂量 2,5-HD 组大鼠体格略消瘦,毛色无光泽,活动减少,后肢肌张力下降,外展明显;高剂量 2,5-HD 组大鼠体格消瘦明显,精神萎靡,后肢瘫痪,后脚掌背翻。

2.2　2,5-HD 对大鼠坐骨神经超微结构影响(图 1)　对照组大鼠坐骨神经髓鞘呈圆形或椭圆形,结构规整,板层清晰,排列致密;轴索位于髓鞘中心,形状规则,边缘光滑规整;2,5-HD染毒组随染毒剂量升高,



注:a:正常髓鞘;b:髓鞘中略有空泡出现;c:髓鞘有分层;d:神经丝排列致密均匀;e,f,g:神经丝排列逐渐稀疏。

图 1　2,5-HD 暴露大鼠坐骨神经组织超微结构变化(横断面,×10 000)

髓鞘形状渐不规则,并出现内折现象;轴索形状渐不规则,部分发生萎缩;神经丝数量渐少,排列稀疏。

表 1　2,5-HD 对大鼠坐骨神经组织 P_0 和 NF 的 mRNA 表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 (mg/kg)	P_0	NF-L	NF-M	NF-H
对照组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
2,5-HD 100	1.02 ± 0.05	0.89 ± 0.06[a]	0.87 ± 0.05[a]	0.91 ± 0.04[a]
200	0.91 ± 0.06	0.54 ± 0.02[a]	0.60 ± 0.07[a]	0.58 ± 0.03[a]
400	0.75 ± 0.03[a]	0.35 ± 0.07[a]	0.25 ± 0.04[a]	0.37 ± 0.05[a]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$。

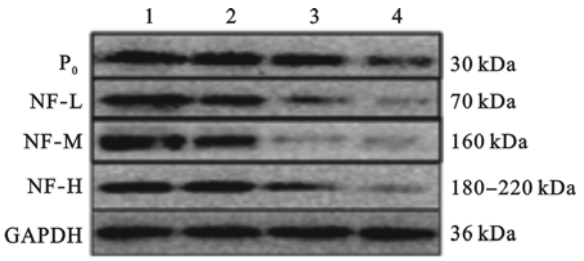
2.3　2,5-HD 对大鼠坐骨神经 P_0 和 NF mRNA 表达影响(表 1)　与对照组比较,400 mg/kg 2,5-HD 染毒组大鼠坐骨神经 P_0 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,随 2,5-HD 染毒剂量增加,大鼠坐骨神经 NF-L、NF-M、NF-H mRNA 表达逐渐降低,呈剂量-反应关系($P < 0.05$)。

2.4　2,5-HD 对大鼠坐骨神经 P_0 和 NF 蛋白表达影响(表 2、图 2)　与对照组比较,400 mg/kg 2,5-HD 染毒组 P_0 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,随 2,5-HD 染毒剂量增加,染毒组大鼠坐骨神经 NF-L、NF-M、NF-H 的蛋白表达逐渐降低,呈剂量-反应关系($P < 0.05$)。

表 2　2,5-HD 对大鼠坐骨神经组织 P_0 和 NF 的蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 (mg/kg)	P_0	NF-L	NF-M	NF-H
对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06
2,5-HD 100	0.95 ± 0.04	0.73 ± 0.08[a]	0.72 ± 0.07[a]	0.91 ± 0.05[a]
200	0.93 ± 0.05	0.44 ± 0.03[a]	0.24 ± 0.01[a]	0.56 ± 0.05[a]
400	0.79 ± 0.04[a]	0.26 ± 0.02[a]	0.12 ± 0.03[a]	0.22 ± 0.02[a]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$。



注:1:对照组;2 ~ 4:100、200、400 mg/kg 2,5-HD 组。

图 2　2,5-HD 暴露对大鼠坐骨神经组织 P_0 和 NF 的蛋白表达影响

3　讨　论

据文献报道,2,5-HD 暴露能导致外周神经组织轴索变性和髓鞘脱失[3-4]。本研究电镜观察显示,对照组大鼠坐骨神经髓鞘质地致密、均匀,神经丝排列均匀、致密,而 2,5-HD 染毒组大鼠坐骨神经髓鞘质地较疏松,尤其高剂量组出现髓鞘分层、缺失等脱髓鞘现象,神经丝数量减少,排列稀疏,且随染毒剂量的增加而加重,提示 2,5-HD 可诱导坐骨神经组织骨架蛋白降解。

P_0 是外周神经髓鞘最主要的结构蛋白,而神经丝是神经元细胞骨架的主要成分。研究表明,2,5-HD 暴露大鼠坐骨神经组织 P_0 表达减少[8],NF-L、NF-M 和 NF-H 蛋白水平下降[9]。本研究结果显示,高剂量 2,5-HD 组大鼠坐骨神经组织 P_0 基因和蛋白水平显著低于对照组,与文献[8]结果一致,大鼠坐骨神经组织 NF-L,NF-M 和 NF-H 基因和蛋白水平显著低于对照组,且呈剂量 - 反应关系,与文献[9]结果基本一致。提示,2,5-HD 暴露可下调 P_0 基因表达,下调 P_0 基因表达很可能是 2,5-HD 导致大鼠坐骨神经组织髓鞘部分缺失的重要机制之一。正常骨架蛋白存在由亚单位到骨架蛋白的聚合和解聚、降解的动态平衡过程。本研究结果显示,2,5-HD 暴露下调 NF-L,NF-M 和 NF-H 基因表达。提示,2,5-HD 很可能通过下调 NF 亚单位基因表达干扰包括 NF 在内的骨架蛋白动态平衡过程,导致轴突萎缩。

参考文献

[1]　邝守仁,黄汉林,刘惠芳,等. 慢性正己烷中毒 102 例临床分析[J]. 中华内科杂志,2001,40(5):329 - 331.
[2]　吴小炼,朱松华. 75 例正己烷中毒性周围神经病临床分析[J]. 临床神经病学杂志,2002,15(3):179 - 180.
[3]　何凤生. 中华职业医学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999.
[4]　Spence PS, Schaumbrug HH. Experimental and clinical neurotoxicology[M]. New York:Oxford Univeristy Press,2000:633 - 648.
[5]　王蘋,谢克勤. 2,5 - HD 对大鼠 DRG 神经元神经丝蛋白表达的影响[J]. 毒理学杂志,2008,22(4):275 - 279.
[6]　刘清君,赵磊,段化伟,等. 2,5 - 己二酮不同作用时间对大鼠坐骨神经 P_0 蛋白及血清 P_0 蛋白抗体水平的影响[J]. 卫生研究. 2010,39(3):275 - 278.
[7]　王青山,侯丽艳,张翠丽,等. 2,5 己二酮对大鼠大脑组织骨架蛋白的影响[J]. 中国公共卫生. 2008. 24(11):1324 - 1325.
[8]　赵磊. P_0 蛋白在正己烷致周围神经损伤中的作用[D]. 北京:中国疾病预防控制中心博士论文,2011.
[9]　Song FY, Zhang QG, Kou RR, et al. 2,5-Hexanedione altered the degradation of low-molecular-weight neurofilament in rat nerve tissues[J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50:4277 - 4284.

收稿日期: 2014 - 03 - 28　　(解学魁编辑　吴少慧校对)