

# 乙体氯氰菊酯对小鼠大脑皮质 $\gamma$ -氨基丁酸水平及相关酶和受体的影响

鲍清<sup>1</sup>, 杨光<sup>1</sup>, 任亚浩<sup>2</sup>, 赵越<sup>2</sup>, 安丽<sup>2</sup>

1. 沈阳化工研究院有限公司安全评价中心, 辽宁 沈阳 110141; 2. 中国医科大学公共卫生学院

**摘要:** **目的** 探讨乙体氯氰菊酯的神经毒性, 为该类药物中毒防治提供理论依据。 **方法** 80 只健康成年昆明种小鼠按体质量随机分为 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。染毒组小鼠以一次经口灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 食用油稀释受试物质, 对照组给予等量食用油。于灌胃后 2、4 h, 每组各取 10 只小鼠大脑皮质, HPLC 法检测  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 水平 ( $\mu\text{mol/g}$ ), 分光光度法检测  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶 (GABA transaminase, GABA-T) 活力 (nmol/min. mg. pro), Real time RT-PCR 法检测 GABA 受体 (GABA-A、GABA-B) mRNA 水平。 **结果** 染毒后 2、4 h, 80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA 水平 ( $99.77 \pm 13.80$ 、 $108.29 \pm 29.67$ ) 高于对照组 ( $72.10 \pm 20.51$ 、 $72.09 \pm 20.49$ ) ( $P < 0.05$ ); 染毒后 2 h, 40、80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA-T 活力 ( $12.45 \pm 2.20$ 、 $11.48 \pm 1.33$ ) 低于对照组 ( $14.09 \pm 1.64$ ) (分别为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ); 染毒后 4 h, 80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA-A mRNA 表达 ( $0.89 \pm 0.07$ ) 低于对照组 ( $1.00 \pm 0.08$ ) ( $P < 0.05$ ), GABA-B mRNA 表达与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 乙体氯氰菊酯可降低小鼠大脑皮质 GABA-T 活力, 使 GABA 增多, 进而反馈性抑制 GABA-A 受体 mRNA 表达。

**关键词:** 乙体氯氰菊酯;  $\gamma$ -氨基丁酸;  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶;  $\gamma$ -氨基丁酸受体

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)11-1300-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.11.006

## Effects of beta-cypermethrin on $\gamma$ -aminobutyric acid level, relevant enzyme and receptor in the cerebral cortex of mice

BAO Qing\*, YANG Guang, REN Ya-hao, ZHAO Yue, AN Li

\* Safety Evaluation Center, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shenyang, Liaoning 110141, China

**Abstract:** **Objective** To explore the neurotoxicity of beta-cypermethrin and to provide a theoretical basis for its poisoning prevention and treatment. **Methods** Eighty healthy adult Kunming mice were randomly divided into four groups, with 20 mice in each group (10 males and 10 females). Three experimental groups were respectively administered with 20, 40 and 80 mg/kg beta-cypermethrin dissolved in edible oil by a single oral gavage. The control group was administered with edible oil. Ten mice in each group were killed at 2 and 4 hours after administration and cerebral cortex was collected. Then the level of gamma-aminobutyric acid (GABA), GABA transaminase (GABA-T) activity and GABA receptor (GABA-A and GABA-B) mRNA expression in the cerebral cortex were detected by high performance liquid chromatograph (HPLC), spectrophotometry and real-time RT-PCR respectively. **Results** GABA levels ( $\mu\text{mol/g}$ ) in the cerebral cortex of mice administrated with 80 mg/kg of beta-cypermethrin at 2 and 4 hours after the treatment were both higher than those of the control group ( $99.77 \pm 13.80$ ) vs. ( $72.10 \pm 20.51$ ), ( $108.29 \pm 29.67$ ) vs. ( $72.09 \pm 20.49$ ), both  $P < 0.05$ . And GABA-T activity (nmol/min. mg. pro) in the cerebral cortex of mice administrated with 40 mg/kg and 80 mg/kg of beta-cypermethrin at 2 hours after the treatment ( $12.45 \pm 2.20$ ), ( $11.48 \pm 1.33$ ) were both lower than that of the control group ( $14.09 \pm 1.64$ ),  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ . Four hours after the administration, the GABA-A mRNA expression in the cerebral cortex of mice administrated with 80 mg/kg of beta-cypermethrin was significantly decreased compared with the control group ( $0.89 \pm 0.07$ ) vs. ( $1.00 \pm 0.08$ ),  $P < 0.05$ , while the GABA-B mRNA expression was not statistically different ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Beta-cypermethrin can decrease GABA-T activity and increase GABA levels in the cerebral cortex of mice. And then the expression of GABA-A receptor mRNA is inhibited by feedback.

**Key words:** beta-cypermethrin;  $\gamma$ -aminobutyric acid;  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase;  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872144)

作者简介: 鲍清 (1965-), 男, 研究方向: 农药毒理, E-mail: baoqing999@126.com。

拟除虫菊酯(pyrethroid, PD)杀虫剂具有高效、低毒、低残留等特点,广泛应用于室内生活和农业生产中。根据化学结构的不同可将 PD 分为 I 型(不含  $\alpha$  氰基)和 II 型(含  $\alpha$  氰基),目前以 II 型使用较多,PD 的神经毒作用及其机制一直是该类农药毒性研究领域的热点。

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是脑内的主要神经递质之一,介导抑制性突触传递作用。突触间隙内的 GABA 可被突触体摄取,经  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶(GABA transaminase, GABA-T)降解失活,因此, GABA-T 对于维持脑内 GABA 水平的稳定起着重要作用。文献报道,PD 可影响受试动物脑组织 GABA 水平和 GABA-T 活力<sup>[1-2]</sup>,表明 GABA 代谢异常可能是 PD 致中枢神经系统功能紊乱的原因之一。突触间隙的 GABA 需与突触后膜上相应的受体结合才能发挥效应, GABA 受体包括 GABA-A、GABA-B、GABA-C 三种亚型,其中 GABA-A、GABA-B 广泛分布于中枢神经系统,目前有关 PD 对 GABA 受体的影响尚未见报道。本研究以目前应用较为广泛的 II 型 PD 类农药乙体氯氰菊酯一次经口染毒小鼠,通过分析脑组织 GABA 水平、GABA-T 活力以及 GABA-A、GABA-B 表达的变化探讨其神经毒性,为该类农药的中毒防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受试物质 乙体氯氰菊酯,又名高效氯氰菊酯,外观呈白色粉末状,分子式为  $C_{22}H_{19}Cl_{12}NO_3$ ,相对分子量为 416.3。其有效成分:总酯为 97.16%,高效体含量为 96%。难溶于水,易溶于酮类及芳烃等有机溶剂。

1.1.2 主要仪器与试剂 LIBRORAEL-40SM 电子天平(日本 Shimadzu 公司),高效液相色谱仪(美国 waters 公司), ODS C18 色谱柱(美国 Thermo 公司), 3K30 低温高速离心机(美国 Sigma 公司), 7500 Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司), Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司); TRIzol(美国 Invitrogen 公司), 牛血清白蛋白、5'-磷酸吡哆醛、 $\gamma$ -氨基丁酸及丹磺酰氯(美国 Sigma 公司), 逆转录试剂盒(Takara 大连分公司), 甲醇及乙腈(国药集团公司), 考马斯亮蓝(华美公司)等。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 健康初成年昆明种小鼠由中国医科大学实验动物中心提供(实验动物生产许可

证号:SCXK(辽)2008-0005,实验动物使用许可证号:SYXK(辽)2008-0005)。将 80 只小鼠按体质量随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半。染毒组小鼠以一次经口灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯,食用油稀释受试物质,对照组给予等量食用油。染毒后连续观察并记录小鼠中毒症状出现的时间、中毒表现及死亡情况,并分别于灌胃后 2、4 h,每组各取 10 只小鼠脑组织供试。

1.2.2 GABA 水平的测定 丹磺酰氯(DNSCL)柱前衍生高效液相色谱法测定脑组织 GABA。称取 100 mg 大脑皮质,加入 2 ml 乙腈,匀浆,超声处理,4 ℃ 13 000 r 离心 10 min,转移上清液,在 40 ℃ 下用高纯氮气吹干,加入 400  $\mu$ l NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液,涡旋 1 min,加入 150  $\mu$ l 丹磺酰氯,涡旋 30 s,65 ℃ 避光水浴 25 min,室温冷却,以 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,用微量进样器进样 20  $\mu$ l。色谱条件如下:择 ODS C18 色谱柱,长 25 cm,柱温为室温;流动相 A 为磷酸二氢钠溶液, pH = 7.2;流动相 B 为 HPLC 级乙腈。梯度洗脱条件:0~7 min, 14% A, 86% B; 7~14 min, 20% A, 80% B; 14~30 min, 26% A, 74% B; 30~35 min, 28% A, 72% B; 35 min, 29% A, 71% B, 平衡 15 min, 50 min 结束洗脱;紫外检测器检测,波长 254 nm。测定标准液的峰面积,并计算出标准曲线回归方程,根据标准曲线回归方程与样品峰面积计算样品 GABA 含量。

1.2.3 GABA-T 活力的测定 以预冷 PBS(内含甘油、Triton X-100、GSH、5'-磷酸吡哆醛、Na<sub>2</sub>EDTA, pH 6.8)将大脑皮质制成 10% 匀浆,采用分光光度法<sup>[3]</sup>测定大脑皮质 GABA-T 活力,蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法<sup>[4]</sup>。

1.2.4 GABA-A、GABA-B mRNA 表达 采用 Real time RT-PCR 法检测脑组织 GABA 受体 mRNA 水平。提取大脑皮质总 mRNA 并逆转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。 $\beta$ -actin 上下游引物分别为:5'-GTCCCT-CACCCTCCCAAAAG-3' 和 5'-GCTGCCTCAACACCT-CAACCC-3',产物长度:266 bp; GABA-A 上下游引物分别为:5'-AAATGACGCTGTGGATTCTGCTC-3' 和 5'-TCCGATGTCAGGTCAAGTTTG-3';产物长度:194 bp; GABA-B 上下游引物分别为:5'-GAACCCT-GCTTGGAGCTATTAC-3' 和 5'-TGCTGCTGAAAT-GACAGGAGTTG-3',产物长度:110 bp。反应体系 20  $\mu$ l:上下游特异性引物各 0.8  $\mu$ l、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10  $\mu$ l、灭菌蒸馏水 6  $\mu$ l、Rox Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l。反应条件为:95 ℃ 30 s 预变性;扩增 40 个循环:95 ℃ 5 s、60 ℃ 34 s;溶解曲线分析:95 ℃

15 s,60 ℃ 1 min、95 ℃ 15 s。测定各实验样本的循环指数。 $\beta$ -actin 作为内参基因,分析 GABA-A、GABA-B mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 12.0 建立数据库并进行统计分析,结果表示为( $\bar{x}\pm s$ )。各组均数比较均采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用最小显著差值法(LSD),检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 症状观察 80 mg/kg 剂量组全部小鼠于染毒 1 h 后出现舔身、躁动、抓搔等症状;染毒 2 h 后陆续出现流涎、痉挛、步态不稳、共济失调等中毒症状,而后出现少动或行动迟缓。40 mg/kg 剂量组 2 只雌鼠于染毒 2 h 后出现舔身、抓搔等症状。20 mg/kg 剂量组小鼠在整个受试期间未见异常。实验期间无动物死亡。

2.2 GABA 水平 见表 1。染毒后 2 h,80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA 水平明显高于对照组( $P<0.05$ );染毒后 4 h,80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA 水平明显高于对照组、20 mg/kg 及 40 mg/kg 剂量组( $P<0.05$ )。

表 1 小鼠大脑皮质 GABA 水平测定结果( $\mu\text{mol/g},\bar{x}\pm s$ )

剂量(mg/kg)	例数	2 h	4 h
0	10	72.10 $\pm$ 20.51	72.09 $\pm$ 20.49
20	10	87.95 $\pm$ 26.47	84.75 $\pm$ 18.89
40	10	91.99 $\pm$ 17.26	75.91 $\pm$ 27.03
80	10	99.77 $\pm$ 13.80*	108.29 $\pm$ 29.67*# $\Delta$

注:与 0 mg/kg 剂量组比较,\* $P<0.05$ ;与 20 mg/kg 剂量组比较,# $P<0.05$ ;与 40 mg/kg 剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.3 GABA-T 活力 见图 1。染毒后 2 h 小鼠大脑皮质 GABA-T 活力随着染毒剂量的增加而逐渐降低,其中 40、80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA-T 活力明显低于对照组(分别为  $P<0.05,P<0.01$ );染毒后 4 h 各剂量组小鼠大脑皮质 GABA-T 活力与对照组相比,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

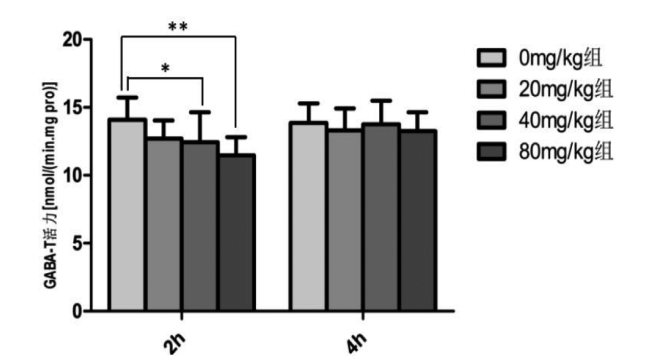


图 1 小鼠大脑皮质 GABA-T 活力检测结果( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

2.4 GABA 受体 mRNA 表达 见表 2。染毒后 2 h 各剂量组小鼠大脑皮质 GABA-A、GABA-B mRNA 表达与对照组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ );染毒后 4 h 各剂量组小鼠大脑皮质 GABA-B mRNA 表达与对照组相比有下降趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA-A mRNA 表达明显低于对照组( $P<0.05$ )。

表 2 小鼠大脑皮质 GABA 受体 mRNA 相对表达( $\bar{x}\pm s$ )

剂量(mg/kg)	例数	GABA-A		GABA-B	
		2 h	4 h	2 h	4 h
0	10	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.13
20	10	0.99 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.12
40	10	1.01 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.13
80	10	0.96 $\pm$ 0.11	0.89 $\pm$ 0.07*	1.01 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.12

注:与 0 mg/kg 剂量组比较,\* $P<0.05$ 。

3 讨论

作为中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,GABA 存在于整个大脑的多种中间神经元和投射神经元,其介导抑制性突触传递作用,从而防止脑内神经元过度兴奋。文献报道,三氟氯氰菊酯染毒大鼠海马 GABA 水平升高<sup>[1]</sup>,氰戊菊酯与氯氰菊酯染毒大鼠大脑皮层、海马 GABA 免疫反应阳性神经细胞数目和阳性细胞面积比增加,阳性细胞积分吸光度明显增强<sup>[5-6]</sup>。本研究结果显示,80 mg/kg 乙体氯氰菊酯染毒小鼠出现明显中毒症状,采用 HPLC 法检测发现小鼠大脑皮质 GABA 水平显著增高,与上述文献报道相一致。GABA-T 是脑内 GABA 代谢的关键酶,GABA-T 受到抑制可使中枢神经系统内 GABA 的含量明显升高。研究发现<sup>[2]</sup>,一次性经口给予溴氰菊酯 6 h 后大鼠脑组织的 GABA-T 活力下降。本研究结果显示,40、80 mg/kg 乙体氯氰菊酯灌胃染毒小鼠,于染毒后 2 h 大脑皮质 GABA-T 活力明显降低,提示 GABA-T 活力下降可能是该药致 GABA 升高的原因之一。

在神经系统中,GABA-A 受体主要介导快速的突触传递抑制效应,受体激活后可开启突触后膜上的离子通道,当神经系统功能受到影响时能快速进行调节<sup>[7]</sup>;GABA-B 受体一方面能间接影响离子通道的开放活性,同时还可以激活突触后神经元内的一系列代谢反应,起到慢突触传递作用<sup>[8]</sup>。本研究发现,染毒后 4 h,80 mg/kg 剂量组小鼠大脑皮质 GABA 含量明显升高,GABA-A mRNA 表达明显降低,各染毒组小鼠大脑皮质 GABA-B mRNA 表达有下降趋势,提示乙体氯氰菊酯首先影响脑内快速突触传递,受体 mRNA