

甲基苯丙胺中毒小鼠脑组织神经元超微结构变化的研究*

李艳明¹ 吴光辉^{1,2} 曾晓锋¹ 赵永和¹ 王尚文¹ 李 桢^{1△}

(1 昆明医学院法医学院 云南 昆明 650500; 2 益阳市公安局 湖南 益阳 413000)

摘要 目的:通过观察甲基苯丙胺中毒后小鼠脑组织超微结构的改变,探讨脑组织超微结构改变与甲基苯丙胺神经毒性机制的关系。方法:将 40 只小鼠随机分为对照组和 3 组实验组(A,B,C)。A 组给予 MA (20mg/kg, ip, single)、B 组给予 MA(20mg/kg, 8am, 8pm, ip× 2d)、C 组给予 MA(20mg/kg, 8am, 8pm, ip× 4d),对照组给予等量生理盐水。用电镜观察前额叶皮质、海马、纹状体三个部位组织神经元胞体超微结构改变,并与空白对照组比较,结果进行统计学处理。结果:给予 MA 后,小鼠各脑区神经元胞体出现神经元固缩、变性、凋亡、坏死等超微病变。结论:MA 可诱导神经细胞发生神经元固缩、变性、凋亡、坏死等超微病变,其变化程度随时间和药物蓄积有逐渐增加的趋势。

关键词:甲基苯丙胺;神经元;凋亡;超微结构;小鼠

中图分类号:Q95-3 R 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-207-04

Ultrastructural Changes in Mice Brain Neurons after Methamphetamine Intoxication*

LI Yan-ming¹, WU Guang-hui^{1,2}, ZENG Xiao-feng¹, ZHAO Yong-he¹, WANG Shang-wen¹, LI Zhen^{1△}

(1 School of Forensic Medicine, Kunming Medical College, Kunming 650500, China;

2 Public Security Bureau of Yiyang, Hunan Yiyang 413000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the brain organization ultrastructural changes and methyl benzene propylamine nerve toxicity mechanism by detecting the ultrastructural changes of brain tissue in methamphetamine poisoning mice.

Methods: A total of 40 mice were divided into control group and experimental groups (A,B,C), with 10 mice in each one. Mice in group A were injected with MA (20 mg·kg⁻¹, ip, single); Mice in group B were injected with MA (20 mg·kg⁻¹, 8 am 8 pm, ip × 2d); Mice in group C were injected with MA(20 mg·kg⁻¹, 8 am 8 pm, ip × 4 d); while the mice of the control group received normal saline. The changes of prefrontal cortex, hippocampus, basal ganglia organization of ultrastructural were detected by electron microscopy.

Results: There were condensation, degeneration, apoptosis, necrosis, ultrastructural alteration in brain neurons after the mice were given MA. **Conclusion:** MA can induce the brain neurons generate cellular swelling, apoptosis, necrosis and cell pyknosis, the severity level of those pathological changes were increased with the longer of the time and the increased of injection times with MA.

Key words: Methamphetamine; Neuron; Apoptosis; Ultrastructure; Mice

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3 R **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-207-04

前言

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)属于苯丙胺类中枢兴奋剂,具有神经毒性。MA 可通过多种作用机制,产生对神经元的损伤作用:①DA 的氧化作用;②对神经元的兴奋性毒性;③使线粒体功能紊乱;④使神经元凋亡等。最近的研究显示,MA 能诱导小鼠纹状体、额叶皮质、海马等部位的神经元发生凋亡^[1],而诱发神经细胞凋亡是 MA 神经毒性作用的分子机制之一。目前 MA 对神经细胞超微结构改变与甲基苯丙胺神经毒性关系方面的研究尚未见报道。本实验通过建立 MA 不同给药时间的动物模型,对小鼠纹状体、额叶皮质、海马三个脑区的超微结构

进行观察,为进一步阐明 MA 毒性机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、给药方法及分组

健康成年昆明种小鼠 40 只(10-12 周),体重 30± 2g,雌雄各半,购自昆明医学院实验动物供应中心。将动物随机分为 MA 单次组(20mg/kg, ip, single)、MA2 天组(20mg/kg, 8am, 8pm, ip× 2d)、MA4 天组(20mg/kg, 8am, 8pm, ip× 4d)和对照组(给予等量生理盐水),每组 10 只。试验前让动物在清洁恒温(室温 18℃)恒湿(相对湿度 50%)的饲养室适应一周,每天抓取一次,保持整个试验过程中自由饮水及进食,并保持 12 小时

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NO30660202);教育部春晖项目(Z2006-1-65003);云南省科技厅项目(2006GH22)

作者简介:李艳明(1983-),男,硕士研究生,研究方向:毒品滥用的研究。

E-mail:497493505@qq.com

△通讯作者:李桢(1959-),女,教授,硕士生导师。E-mail:lizhenlaura@126.com

李艳明,吴光辉,同为第一作者,对本文皆有同等贡献。

(收稿日期:2010-10-06 接受日期:2010-10-31)

明暗交替光照。

1.2 试验仪器及试剂

透射电镜(JEM-100CX, 日本);Leica Ultracut R 型超薄切片机(德国 LEICA 公司产品);HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文报告分析系统(同济医科大学千屏影像工程公司产品);甲基苯丙胺粉剂(中国药品生物制品检定所,公安部物证鉴定中心提供,纯度为 99%);戊巴比妥钠(上海化学试剂公司);钨酸;环氧树脂 618;柠檬酸铅;醋酸铀;其余试剂为国产分析纯产品。

1.3 电镜样品制备

每组随机选 5 只小鼠,于相应时间点用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)进行麻醉后拉颈处死,迅速剥离脑组织,并将之置于冰袋上的玻璃培养皿内,用分离器快速剥离皮质,暴露皮质内面、海马、纹状体等结构,同时将 50 μ l 电镜固定液(3.5%戊二醛)用注射器淋于上述部位,快速分离海马(CA)、纹状体(CPU)、前额叶皮质(PFC),分瓶分装,切成 1mm³ 小块,再用 1%钨酸后固定,逐级丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,用超薄切片机制片,超薄切片用 2%醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察,摄片。

1.4 统计学处理

对电镜下神经元胞体超微结构变化计数结果进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 电镜观察的结果

电镜下观察各 MA 组与对照组小鼠脑内神经元胞体,结果各给药组都能观察到各种病理性超微结构改变,可归纳为以下四类改变:

2.1.1 神经元固缩 神经元体积明显缩小,胞浆电子密度增高,粗面内质网、高尔基体扩张,核糖体和脂褐素颗粒增多;线粒体明显肿胀,有空化,嵴稀少,嵴间隙增宽,有的甚至断裂、消失;核电子密度显著增高,核膜皱折,核膜下异染色质呈团块状聚集,核仁消失或变小。粗面内质网轻度扩张。线粒体增大、畸形,有的嵴肿胀,有的嵴紊乱、减少,出现包含物(如图 1)。

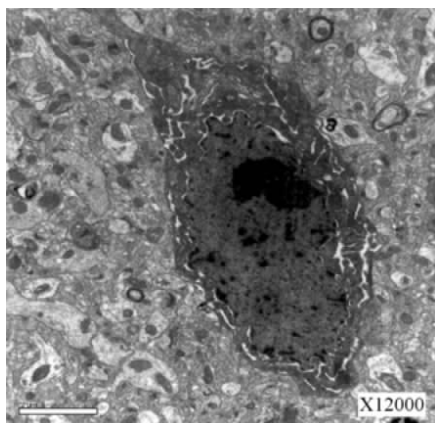


图 1 前额叶皮质固缩的神经元

Fig.1 Pyknotic neurons of Prefrontal cortex

2.1.2 神经元水样变性 血管周围及神经纤维间不同程度水肿;神经细胞灶性水肿,以尼氏体溶解、水样变性为主。开始,细胞外形、细胞核无明显改变,胞浆细胞器中仅有粗面内质网减少、断裂、脱颗粒、轻度扩张,核糖体稀疏、减少。继续发展,细胞核

也可见水肿,密度降低,核内结构不清;胞浆肿胀,粗面内质网扩张、核糖体解聚,线粒体肿胀、嵴间隙增宽、嵴断裂、消失及脱颗粒,高尔基体扁囊和囊泡扩张。随着时间延长,轴突内细胞器减少,神经纤维肿胀,部分有髓神经纤维髓鞘松解,可见髓鞘分离;神经毡水肿,轴突内细胞器稀疏(如图 2)。

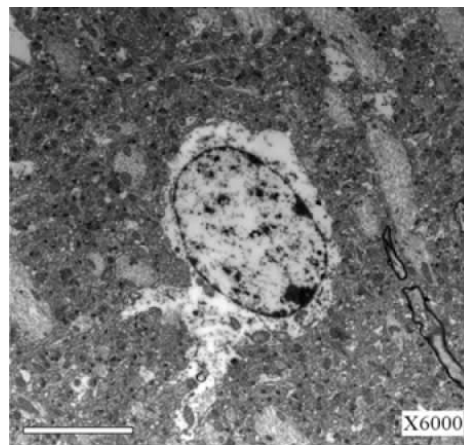


图 2 海马神经元水样变性

Fig.2 Hydropic degeneration of Hippocampal neurons

2.1.3 神经元凋亡 电镜下,可观察到早、中、晚期凋亡神经元:凋亡早期,细胞皱缩,细胞核染色质轻度浓缩、边集,电子密度高于正常,核仁消失,核膜尚完整。凋亡中期,核异染色质更加浓缩,均质无结构,电子密度更高。凋亡晚期,核异染色质高度浓聚、边集,进而核裂解成几个碎块,此期核膜不规则或核膜破裂(如图 3)。凋亡神经元除了细胞核的改变外,胞浆细胞器也有变化。早期胞浆浓缩减少,电子密度明显增加,中晚期,出现粗面内质网、核糖体、线粒体溶解,电子密度略有下降。细胞最后降解成膜包裹的凋亡小体。

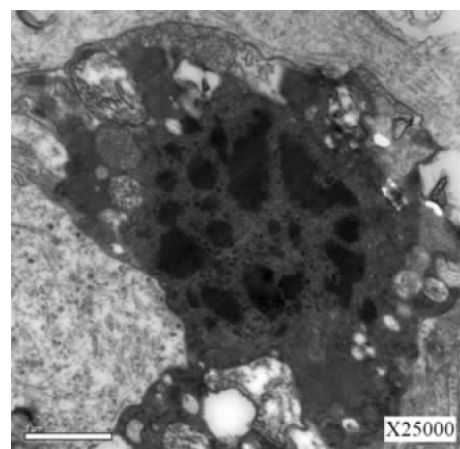


图 3 纹状体的早期凋亡神经元

Fig.3 the basal ganglia early apoptosis neurons

2.1.4 神经元液化性坏死 神经元液化性坏死主要继发于严重水样变性之后。胞体明显肿胀,出现虫蚀状和空泡化,粗面内质网扩张,线粒体肿胀、嵴破坏,胞浆肿胀,结构不清,细胞核染色质浓缩,凝集在核膜、核仁周围,细胞膜完整性破坏;核水肿,核内结构不清,核内结构疏松,中后期细胞膜崩解,细胞核溶解,细胞内容物逸出(如图 4)。

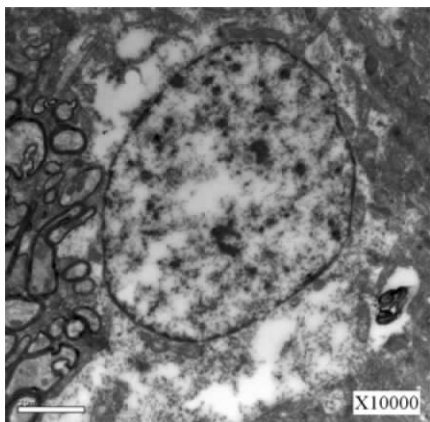


图4 前额叶皮质液化坏死的神经纤维
Fig.4 The basal ganglia neurons edema and necrosis

表1 各组动物各部位神经元胞体超微结构变化的比较
Table 1 Comparison of the ultrastructure changes in different parts of the cell bodies of neurons

Parts	Groups	N	Degenerate neuron	Apoptotic neuron	Necrotic neuron
CPU	control	239	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)
	MA 1time group	234	3(1.28%)	4(1.70%)	3(1.28%)
	MA 2day group	224	12(5.35%)	11(4.91%)	9(4.01%)
	MA 4day group	218	25(11.46%)	20(9.17%)	18(8.25%)
CA	control	252	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)
	MA 1time group	245	4(1.63%)	5(2.04%)	3(1.22%)
	MA 2day group	238	13(5.46%)	12(5.04%)	10(4.20%)
	MA 4day group	231	20(8.65%)	24(10.38%)	22(9.52%)
PFC	control	242	0(0.00%)	1(0.41%)	0(0.00%)
	MA 1time group	236	4(1.69%)	3(1.27%)	3(1.27%)
	MA 2day group	221	23(10.4%)	22(9.95%)	19(8.59%)
	MA 4day group	214	39(18.22%)	33(15.42%)	30(14.01%)

较,差异也均有统计学意义(P 均小于 $\alpha =0.0083$),这说明:对照组超微结构正常,各实验组出现变性、凋亡、坏死等超微病变,而且随药物的累积和时间的延长,病变越来越加重。

2.3 电镜下各组 MA 中毒小鼠脑神经元轴突、树突及突触的超微病理改变

a.水样变性:轴突、树突肿胀,线粒体肿胀,空泡化,轴突、树突透亮;b.退化性变性:轴突、树突神经微管和神经微丝崩解,线粒体肿胀,轴质结构紊乱;c.髓鞘板层分离、断裂(如图 5)。

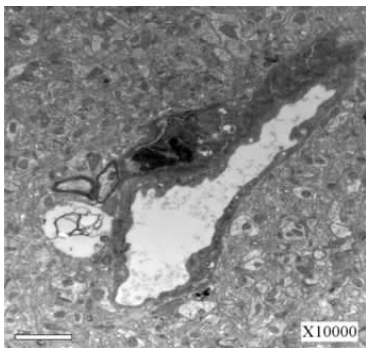


图5 纹状体的神经元水肿、坏死
Fig.5 Liquefaction necrosis of the nerve fibers of Prefrontal cortex

2.2 各组间神经元胞体超微结构变化的比较

先在电镜下筛选超薄切片,每个动物同一取材部位包埋块选取 3 张,同组 2 只动物同一部位共选 6 张超薄切片。电镜下观察每张片时,“弓”字形移动标本,在 3000 倍镜下选取相邻 10 个非重叠视野,计数每个视野中神经元总数和变性、凋亡、坏死神经元数目,同一部位 6 张片共 60 个视野相应数值相加。在判定神经元有无病变时,可在不造成电镜图像移动的前提下,适当调高倍数以利观察、判断,神经元计数统一以 3000 倍镜为准。变性、凋亡、坏死以百分比表示(见表 1)。

经 X^2 检验,同一取材部位,四组间变性、凋亡、坏死神经元百分比的差异比较均有统计学意义(P 均小于 $\alpha =0.05$),对纹状体、海马、额叶皮质三个部位各组间三种病变神经元百分比分别进行 X^2 分割检验,每两组间三种病变神经元百分比两两比

2.4 电镜下各组 MA 中毒小鼠脑组织间质的病理变化

主要表现为胶质细胞增多、间质水肿为主,可见血管周围肿胀、间隙增宽,血管内皮细胞肿胀。

2.5 电镜下各组 MA 中毒小鼠脑神经元线粒体形态学观察

各给药组小鼠脑神经元线粒体均可见到明显改变。初起,线粒体明显肿胀,有空化,嵴稀少,嵴间隙增宽;随后,线粒体增大、畸形,有的嵴肿胀,有的嵴紊乱、减少,出现包含物,有的嵴断裂、消失及脱颗粒。最后,线粒体肿胀、嵴破坏,可见到线粒体溶解,以及内质网清除老化、被损害的线粒体。甲基苯丙胺单次组主要以线粒体肿胀,嵴间隙增宽,嵴膜颗粒减少为主;甲基苯丙胺 2 天组、甲基苯丙胺 4 天组则随时间的延长和药量的累积线粒体严重受损的表现逐渐增多,如线粒体增大、畸形,有的嵴肿胀,有的嵴紊乱、消失及脱颗粒,线粒体肿胀、嵴破坏,线粒体溶解等,也可见线粒体的固缩、空化等改变(如图 6)。

3 讨论

研究证实 MA 属于阳离子脂溶性分子,很容易通过血脑屏障研究证实 MA 属于阳离子脂溶性分子,很容易通过血脑屏障直接作用于脑细胞,产生神经毒性,其毒性机制主要有多巴胺信号转导的影响和 DA 的氧化作用^[2-3]、谷氨酸介导的兴奋性毒

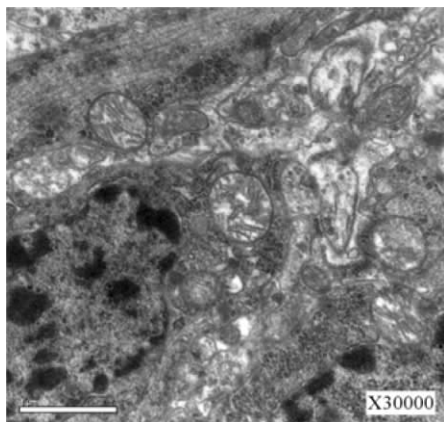


图6 海马神经元线粒体肿胀

Fig.6 Mitochondrial swelling of hippocampal neurons

性作用^[4]、氧化应激和细胞因子的形成^[5-6]、线粒体功能紊乱^[7]、诱导神经细胞发生凋亡^[7]等。Deng 等^[8]研究表明,MA 可降低神经元细胞线粒体呼吸作用和膜电位,促进 Cytochrome C 的释放,活化 Caspases 级联反应,从而最终诱导神经元细胞凋亡。Judy P.Q.Zhu 等^[9]发现:在单次和多次给予甲基苯丙胺后,小鼠纹黑突多巴胺能神经末梢及突触后及神经末梢均受到损伤。这些结果提示 MA 中毒可导致神经元的超微结构的改变。

在 MA 的环境中通过体外培养大鼠额叶皮层神经元细胞可导致 MA 对神经元的毒性作用,伴核小体 DNA 断裂和细胞核的结构破坏,表明其毒性机制有凋亡途径的参与^[10]。

本实验对 MA 中毒后小鼠多部位脑组织进行电镜观察:每个部位电镜下均能观察到神经元固缩、水样变性、凋亡、坏死等多种超微结构病理改变,轻则细胞变性,重则细胞死亡,细胞变性为主要改变,细胞死亡是凋亡与坏死共存。各部位脑神经元轴突、树突及突触均有不同程度的水样变性(如轴突、树突肿胀,线粒体肿胀,空泡化,轴突、树突透亮等)、退行性变性(轴突、树突神经微管和神经微丝崩解,线粒体肿胀,轴质结构紊乱)、髓鞘板层分离、断裂等改变;各部位脑组织间质内均可见胶质细胞增多、间质水肿为主,可见血管周围肿胀、间隙增宽,血管内皮细胞肿胀。对照组超微结构正常,各实验组出现神经元固缩、变性、凋亡、坏死等超微病变,而且随药物的累积和时间的延长,病变越来越加重。

本研究还发现 MA 不仅影响神经元细胞核的结构,而且对细胞质中的多种细胞器产生显著的影响,特别是对线粒体结构的破坏。其原因是由于线粒体在细胞凋亡中起重要的作用,当细胞受到毒性损伤时,线粒体会释放大量的细胞色素 C,细胞色素 C 参与细胞凋亡的信号转导,从而引发细胞凋亡^[11-12]。神经细胞固缩是神经细胞的慢性病理变化,常见于慢性病,如麻痹性痴呆、慢性缺血病变、长期低氧状态,创伤后或中暑后 24 小时可见^[13],本实验中甲基苯丙胺中毒小鼠脑内额叶皮质、海马、纹状体均观察到较多固缩的神经细胞,而对照组未见明显固缩

神经细胞,说明甲基苯丙胺急性中毒可以导致神经细胞固缩,其损害机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Deng X, Wang Y, Chou J, Cadet JL. Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method [J]. Brain Res., Mol Brain Res 2001, 93:64-69
- [2] Volz T J, Hanson G R, Fleckenstein A E. The role of the plasma membrane dopamine and vesicular monoamine transporters in methamphetamine-induced dopaminergic deficits [J]. J Neurochem, 2007, 101(4):883-888
- [3] Thomas D M, Francescutti-Verbeem D M, Kuhn D M, The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. J Neurochem, 2008, 105(3):605-616
- [4] Tata D A, Yamamoto B K. Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum [J]. Synapse, 2008, 62(5):325-336
- [5] Hozumi H, Asanuma M, Miyazaki I, et al. Protective effects of interferon- γ against methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. Toxicol Lett, 2008, 177(2):123-129
- [6] Zhang X, Dong F, Mayer G E, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 exacerbates methamphetamine-induced dopamine depletion in the striatum in rats [J]. Neuroscience, 2007, 150(4):950-958
- [7] Wu C W, Ping Y H, Yen J C, et al. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine-induced apoptosis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 220(3):243-251
- [8] Deng X, Wang Y, Chou J, et al. Methamphetamine causes Widespread apoptosis in the mouse brain: Evidence from using an improved TUNEL histochemical method [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 93(1):64-9
- [9] Judy P.Q.Zhu, Wenjing Xu, Nieves Angulo, et al. Methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain: Comparison of a binge to an acute bolus drug administration [J]. Neuro Toxicology, 2006, 27: 131-136
- [10] Stumm G, Schlegel J, Schafer T, et al. Amphetamine induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons [J]. FASEB, 1999, 13:1065
- [11] Miyazaki W, Lwasaki T, Takeshita A, et al. perinatal exposure to polychlorinated biphenyls alters excitatory synaptic transmission and short-term plasticity in the hippocampus of the adult rat [J]. Neurotoxicology, 2003, 24:851-860
- [12] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 教育出版社, 2000: 461
- [13] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 教育出版社, 2000: 461
- [13] 吴秀枝, 曾庆杏等主编. 神经病理学彩色图谱[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 19
- [13] Wu xiu zhi, zeng qing xing, et al. color atlas of neuropathology [M]. Beijing: People's health press, 2002: 19