

## 氯化锰对大鼠血-脑脊液屏障的损伤作用

敬海明<sup>1,2</sup>, 刘建中<sup>2</sup>, 高文晖<sup>2</sup>, 赵超英<sup>2</sup>, 马玲<sup>2</sup>, 李国君<sup>1,2</sup>

(1. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院, 北京 100069; 2. 北京市疾病预防控制中心北京市预防医学研究中心北京市食物中毒诊断溯源技术重点实验室, 北京 100013)

**摘要:** **目的** 探讨氯化锰对大鼠脑脉络丛组织的毒性损伤作用。**方法** 大鼠 ip 给予氯化锰 6 mg(Mn) · kg<sup>-1</sup> 建立不同暴露时长(30 d, 90 d 及 90 d 后无处理观察 30 d)的氯化锰中毒动物模型,各时间点染毒结束后采集血清与脑脊液(CSF)样本,提取侧脑室的脉络丛组织。溴甲酚绿法和 ELISA 法检测血清白蛋白(SALB)与 CSF 白蛋白(CALB)水平,并计算 CSF 白蛋白指数。光镜与透射电镜下检测大鼠脉络丛组织、细胞及亚细胞结构的病理形态学改变。**结果** 氯化锰 30 d 组、氯化锰 90 d 组及氯化锰 90 d + 30 d 恢复组 CSF 白蛋白、CSF 白蛋白指数均明显高于其相应的对照组( $P < 0.05$ ),并且氯化锰 30 d 组 CSF 白蛋白、CSF 白蛋白指数低于氯化锰 90 d 组与氯化锰 90 d + 30 d 恢复组( $P < 0.05$ ),氯化锰 90 d 组 CSF 白蛋白、CSF 白蛋白指数低于氯化锰 90 d + 30 d 恢复组,但无统计学意义。光镜和电镜观察发现,氯化锰导致脉络丛上皮细胞形状不规则,微绒毛结构紊乱、缩短;胞浆内出现空泡、核质凝聚,线粒体结构破坏,细胞间连接部分断裂或消失等,随染氯化锰时间的延长有加重的趋势,并且脱离氯化锰接触 30 d 后仍表现为进行性加重。**结论** 氯化锰可以引起脉络丛组织病理形态学改变,具有时效性与不可逆性的特征;CSF 白蛋白及 CSF 白蛋白指数与脉络丛的损伤程度呈正相关,可以作为判断血-脑脊液屏障损伤程度的参考指标。

**关键词:** 氯化锰; 血脑屏障; 脉络丛; 白蛋白类

**中图分类号:** R994.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)04-0364-05

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.04.007

锰是机体所必需的一种微量元素,但过量可引起暴露时又可引起多巴胺能神经元的损伤,对其机制的探讨,一直以来都是人们研究的热点。尤其是近年来,甲基环戊二烯三羰基锰(methyl-cyclopentadienyl-manganese-tricarbonyl, MMT)作为汽油添加剂的使用而引起的大气锰(MnCl<sub>2</sub>)污染日益严重,逐渐引起国内外学者对长期低剂量锰暴露研究的重视<sup>[1]</sup>。有研究报道称,血锰过高时主要通过由脉络丛上皮细胞所形成的血-脑脊液屏障(blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB)向脑内转运<sup>[2]</sup>。BCB 作为锰过量暴露时向脑内转运的重要途径,其损伤发生在多巴胺能神经元之前,研究并掌握锰早期对于 BCB 的毒性损伤作用及其机制,可以为今后制定职

业与环境因素锰及其化合物所致神经退行性疾病的早期有效防治措施提供理论依据。本研究通过观察脉络丛组织的病理形态学改变及 BCB 的损伤指标脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)白蛋白指数<sup>[3]</sup>探讨氯化锰对脉络丛(choroid plexus, CP)的损伤作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和仪器

MnCl<sub>2</sub> 纯度 > 99%, 购自美国 Sigma 公司; 白蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所); 蛋白标准液(南京建成生物工程研究所); KT-354 大鼠微量白蛋白 ELISA 试剂盒(美国 Kamiya 生物公司); 680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); SCOT-II BT224 型半自动生化分析仪(意大利 Biotecnica 公司); CH30 生物相差显微镜(日本 Olympus 公司); 图像采集分析软件 UV-G 显微粒度分析系统(北京和众视野科技有限公司); JEM-1230 透射电子显微镜(日本 Jeol 公司); 石蜡包埋机、切片机、展片机与自动染色机均为 Leica 公司产品。

#### 1.2 动物分组与处理

60 只 5 周龄大的 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,

**基金项目:** 北京市留学人员科技活动择优资助项目(2007-62); 北京市“十百千”卫生人才培养专项经费资助(2009); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目资助(2011)

**作者简介:** 敬海明(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事卫生毒理学研究, E-mail: haiming\_jing518@yahoo.com; 李国君(1970-), 女, 研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事卫生毒理学研究, E-mail: guojunli88@yahoo.com。

**通讯作者:** 李国君, E-mail: guojunli88@yahoo.com, Tel: (010)64407197

115 ~ 135 g, 由军事医学科学院提供, 动物许可证号: SCXK-1 (军) 2007-004, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 分别为氯化锰 30 d 组、氯化锰 90 d 组及氯化锰 90 d + 30 d 恢复组与相应的对照组 (氯化锰 30 d 对照组、氯化锰 90 d 对照组、氯化锰 90 d + 30 d 恢复对照组)。氯化锰组 ip 给予无水氯化锰  $6 \text{ mg}(\text{Mn}) \cdot \text{kg}^{-1}$  染毒, 每周染毒 6 d, 周日停染, 相应的对照组给予相同剂量的生理盐水处理。

### 1.3 样本采集

各时间点染毒结束后, 经腹腔麻醉后消毒颈部皮肤, 用  $0.45 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$  的蝶形针经环枕膜穿刺待有落空感时见清亮 CSF 流出, 以注射器轻抽 CSF 约  $100 \mu\text{l}$  注入预冷的 Eppendorf 管; 从下腔静脉抽取血液  $6 \sim 8 \text{ ml}$ , 注入无肝素处理的血液收集管, 室温放置至少  $0.5 \text{ h}$ ,  $600 \times g$  离心  $30 \text{ min}$ , 分离血清; 采集实验组与正常对照组动物双侧侧脑室的脉络丛组织。

### 1.4 血清白蛋白 (SALB) 与脑脊液白蛋白 (CALB) 的检测及 CALB 指数的计算

SALB 采用溴甲酚绿法在 BT224 型半自动生化分析仪上测定, CALB 采用大鼠微量白蛋白 ELISA 试剂盒按说明书操作后以全自动酶标仪进行测定,  $\text{CALB 指数} = \text{CALB} / (\text{SALB} \times 10^{-3})$ 。

### 1.5 光镜、电镜下观察脉络丛细胞形态

各组取 3 只大鼠的脉络丛用生理盐水彻底冲洗后合并, 常规的 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 制作成病理切片标本, 每组至少 10 张, 光镜下观察组织和细胞形态变化。

### 1.6 透射电镜观察脉络丛上皮细胞超微结构

各组分别将 2 只大鼠的脉络丛用 2.5% 戊二醛固定, 再用 1% 锇酸后固定, 通过丙酮系列 (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) 脱水, 包埋在 Epon812 中, 制成超薄切片, 用柠檬酸铅及醋酸铀染色, 在透射电镜下观察细胞超微结构的变化 (每组至少观察 5 张)。

### 1.7 统计学分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS11.5 统计软件处理, 组间比较采用单因素方差分析和 SNK 检验。

## 2 结果

### 2.1 锰对大鼠脑脊液白蛋白, 血清白蛋白及脑脊液白蛋白指数的影响

氯化锰组 CALB 与 CALB 指数与其相应的对照组比较均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 氯化锰 30 d 组的

CALB 与 CALB 指数低于氯化锰 90 d 和氯化锰 90 d + 30 d 恢复组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 氯化锰 90 d 组 CALB 与 CALB 指数低于氯化锰 90 d + 30 d 恢复组, 但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 锰对大鼠脑脊液白蛋白 (CALB), 血清白蛋白 (SALB) 及脑脊液白蛋白 (CALB) 指数的影响

Tab.1 Effect of manganese on CSF albumin (CALB), serum albumin (SALB) and CSF albumin index (CALB index) in rats

组别	CALB/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SALB/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CALB 指数
氯化锰 30 d 对照	$109 \pm 3$	$39.4 \pm 1.4$	$2.77 \pm 0.13$
氯化锰 30 d	$292 \pm 14^*$	$39.1 \pm 3.5$	$7.49 \pm 0.44$
氯化锰 90 d 对照	$100 \pm 6$	$38.5 \pm 2.1$	$2.59 \pm 0.12$
氯化锰 90 d	$322 \pm 24^{*#}$	$39.1 \pm 3.5$	$8.23 \pm 0.30^{*#}$
氯化锰 90 d + 30 d 恢复对照	$95 \pm 5$	$37.8 \pm 1.8$	$2.51 \pm 0.21$
氯化锰 90 d + 30 d 恢复	$362 \pm 28^{*#}$	$37.9 \pm 1.2$	$9.58 \pm 0.94^{*#}$

大鼠 ip 给予无水氯化锰  $6 \text{ mg}(\text{Mn}) \cdot \text{kg}^{-1}$ , 分别持续 30 d, 90 d 以及 90 d 后再恢复 30 d. CALB 指数 =  $\text{CALB} / (\text{SALB} \times 10^{-3}) \bar{x} \pm s, n = 5$ .

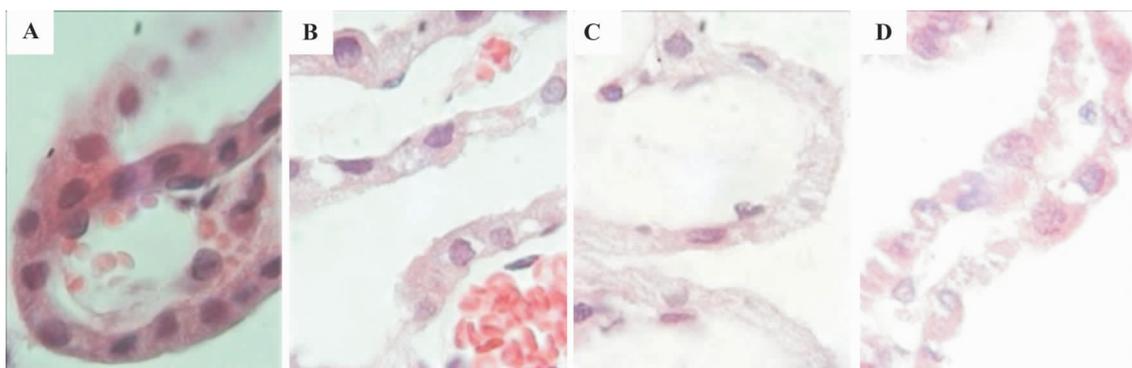
\*  $P < 0.05$ , 与相应对照组比较; #  $P < 0.05$ , 与氯化锰 30 d 组比较。

### 2.2 锰对大鼠脉络丛组织及上皮细胞形态的影响

各对照组脉络丛组织结构清晰, 上皮细胞排列整齐, 细胞核大而圆, 染色质均匀, 位于细胞中央, 细胞质染色较浅, 细胞基底部可见毛细血管 (图 1A)。染氯化锰 30 d 后, 脉络丛上皮细胞的排列开始出现紊乱, 有的细胞核浓染变形, 可见细胞肿大现象, 脉络丛上皮与其基底部的血管之间部分脱落 (图 1B)。染氯化锰 90 d 后脉络丛组织混乱, 上皮细胞之间界限不清, 细胞核大小不一, 有的缺失, 胞浆絮状, 血管与上皮之间完全脱落 (图 1C)。染氯化锰 90 d 后无处理观察 30 d 后脉络丛组织的改变更加明显, 细胞萎缩, 胞膜不清, 细胞核发生浓缩、碎裂、溶解等, 类似于“凋亡细胞”的死亡现象, 细胞间的连接部分消失等 (图 1D)。由此可见, 随染氯化锰时间的延长脉络丛的损伤性改变逐渐加重, 并且在脱离氯化锰接触 30 d 后仍然表现为损伤持续性加重的特征。

### 2.3 锰对大鼠脉络丛细胞超微结构的影响

如图 2 ~ 图 4 所示, 各对照组侧脑室的脉络丛上皮细胞正常, 核大而圆, 胞质内线粒体丰富, 上皮细胞间近游离端可见完整的紧密连接结构, 并且上皮细胞游离端多不规则, 自质膜衍生出许多微绒毛,

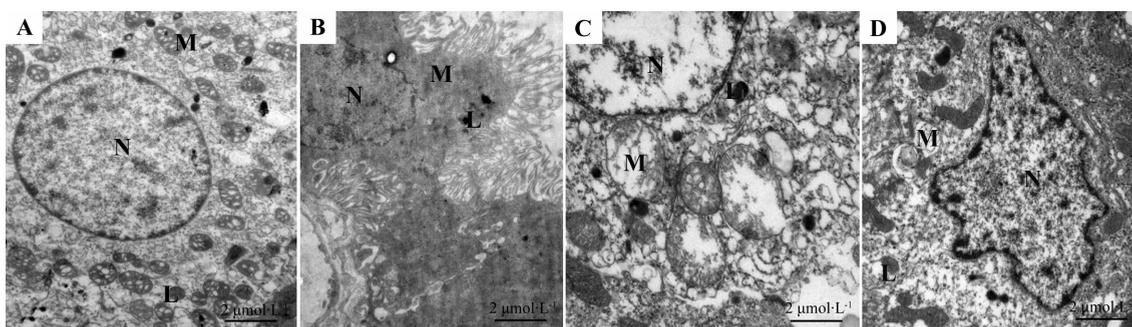


**图 1 锰对大鼠脉络丛病理组织学的影响 (HE ×100)**. 分组处理见表 1. A: 氯化锰 30 d 对照组; B: 氯化锰 30 d 组, 脉络丛上皮扁平, 细胞排列紊乱; C: 氯化锰 90 d 组, 脉络丛组织形态模糊不清, 细胞核大小不一, 有的缺失; D: 氯化锰 90 d + 30 d 恢复组, 细胞膜不清, 胞核浓缩、溶解, 细胞间连接模糊.

**Fig. 1 Effect of manganese on histopathological changes in choroid plexus of rats (HE ×100).**

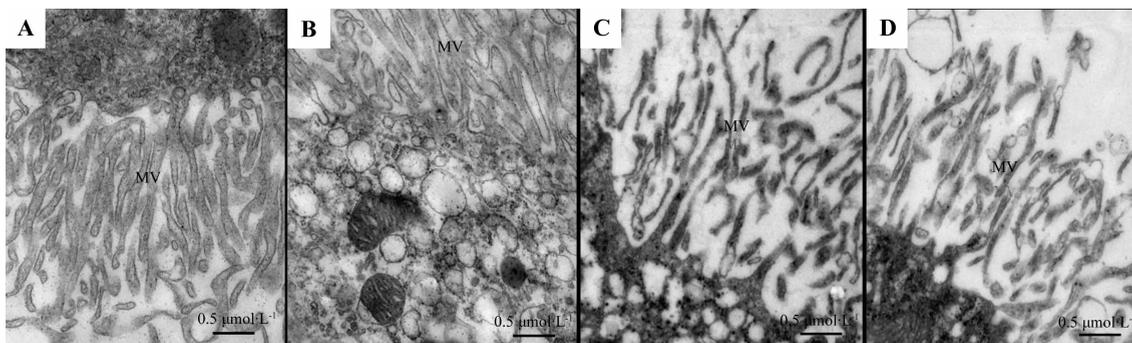
排列整齐, 上皮下为富含毛细血管的基质。各氯化锰处理组脉络丛上皮细胞均发生不同程度的改变, 表现为暗细胞数增加, 细胞核浓缩深染, 核膜皱缩变形, 细胞质空泡增加, 微绒毛缺失, 溶酶体增加, 粗面

内质网肿胀, 以及细胞间紧密连接间隙变宽、断裂, 甚至消失, 随染氯化锰时间延长, 损害加重, 并在脱离氯化锰接触 30 d 后仍有进行性加重的趋势, 呈现出氯化锰毒性病程依赖性模式。



**图 2 锰对大鼠脉络丛上皮细胞细胞核(N)、线粒体(M)与溶酶体(L)的影响**. 分组处理见表 1. A: 氯化锰 30 d 对照组; B: 氯化锰 30 d 组, 胞核变小, 核膜皱缩变形, 线粒体空泡样改变, 溶酶体破裂变小; C: 氯化锰 90 d 组, 胞核皱缩变形, 线粒体空泡样改变, 嵴有脱落现象, 溶酶体破裂变小; D: 氯化锰 90 d + 30 d 恢复组, 核膜皱缩, 染色质浓染, 似凋亡, 线粒体肿大, 嵴脱落, 可见大量空泡, 溶酶体增加.

**Fig. 2 Effect of manganese on nucleus(N), mitochondria(M) and lysosome(L) in choroid plexus epithelia of rats.**



**图 3 锰对大鼠脉络丛上皮细胞微绒毛(MV)的影响**. 分组处理见表 1. A: 氯化锰 30 d 对照组; B: 氯化锰 30 d 组微绒毛肿大; C: 氯化锰 90 d 组微绒毛排列紊乱; D: 氯化锰 90 d + 30 d 恢复组微绒毛缺失, 排列紊乱.

**Fig. 3 Effect of manganese on microvilli (MV) in choroid plexus epithelia of rats.**

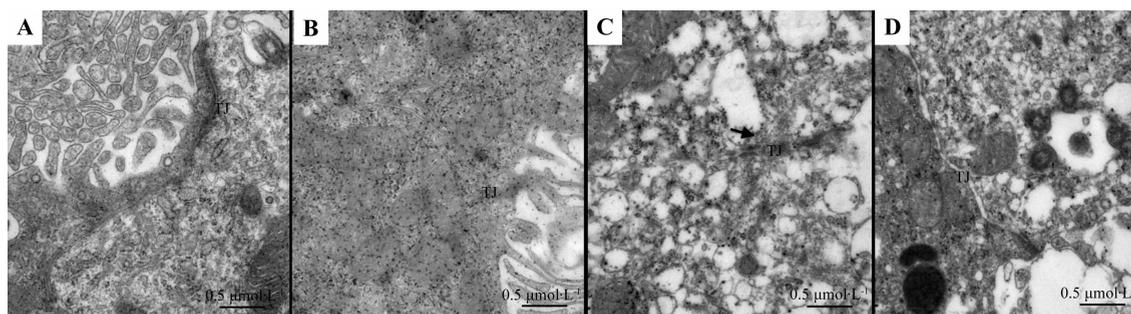


图 4 锰对大鼠脉络丛上皮细胞间紧密连接(TJ)的影响. 分组处理见表 1. A: 对照组;B:氯化锰 30 d 组细胞间紧密连接局部模糊不清;C:氯化锰 90 d 组细胞间紧密连接局部断裂缺失;D:氯化锰 90 d + 30 d 恢复组细胞间紧密连接明显变宽,局部有断裂.

Fig. 4 Effect of manganese on tight junction (TJ) in the choroid plexus epithelia of rats.

### 3 讨论

BCB 主要是由室管膜内陷于第三、四脑室与侧脑室分化形成的脉络丛组织上皮细胞间的紧密连接所构成,专司外周血循环与 CSF 循环之间的物质转运<sup>[4]</sup>。脉络丛组织由脉络丛上皮与富含窗毛细血管的基质构成,其上皮细胞是立方形或矮柱形细胞,细胞表面有许多微绒毛,细胞核大而圆,胞质内有丰富的线粒体<sup>[5]</sup>。脉络丛上皮为一具有活性的界面,不仅可以通过其表面的微绒毛分泌 CSF,而且在保护脑组织免受一些血液中的内源性、外源性有害物质损害方面也起着非常重要的作用<sup>[4]</sup>。当血液中的有毒物质(如重金属氯化锰等)水平增高时,脉络丛可以通过结合蓄集的方式阻止其进入 CSF<sup>[6]</sup>。但是,脉络丛对外源性物质的结合能力是有限的,当有毒活性物质蓄积到一定量时便会破坏脉络丛的结构和功能<sup>[7]</sup>,血清中有毒金属与非金属离子就失去了结合位点而不受限制地进入 CSF<sup>[8]</sup>,使神经系统的代谢及功能发生紊乱,并引起一系列神经生理生化改变。

本研究应用光镜与透射电镜观察了氯化锰对脉络丛的病理形态学影响,结果发现脉络丛是氯化锰过量暴露时一个重要的靶部位,氯化锰可致脉络丛上皮细胞发生不规则萎缩变小,微绒毛结构紊乱、缩短,胞浆内出现空泡、核质凝聚,线粒体结构破坏,细胞之间的紧密连接出现部分断裂与消失等,并且这些改变随染氯化锰时间的延长表现为加重的趋势,即使在恢复期仍可进行性加重。说明锰可以蓄积在脉络丛中,且脉络丛蓄积锰的作用有一定的限度,当超过限度时,可引起脉络丛结构变化影响其屏障功能完整性。

CSF 中约 90% 的成分来源于脉络丛组织的分泌<sup>[9]</sup>。脑脊液对脑组织具有支持、保护与营养作用,正常生理状态下,其成分受 BCB 的严格调控而保持

相对稳定,但是,在脑组织发生老化以及神经退行性疾病时 CSF 中的一些血源性蛋白分子含量会增加,可以作为反映 BCB 损伤的指数<sup>[10]</sup>,如 CSF 白蛋白指数等<sup>[11]</sup>。本研究结果发现,染氯化锰可以引起 CALB 浓度以及 CALB 指数升高,升高水平与染氯化锰时间长短以及脉络丛组织的病理结构改变呈正相关,说明 CALB 浓度及 CALB 指数可以作为判断氯化锰对 BCB 损伤程度的参考指标,可以为今后制定作为职业与环境因素的氯化锰及其化合物所致神经退行性疾病的早期有效防治措施提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] Pfeifer GD, Roper JM, Dorman D, Lynam DR. Health and environmental testing of manganese exhaust products from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline [J]. *Sci Total Environ*, 2004, (334-335):397-408.
- [2] Murphy VA, Wadhvani KC, Smith QR, Rapoport SI. Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier[J]. *J Neurochem*, 1991, **57**(3):948-954.
- [3] Okamura T, Ishibashi N, Zurakowski D, Jonas RA. Cardiopulmonary bypass increases permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier[J]. *Ann Thorac Surg*, 2010, **89**(1):187-194.
- [4] Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, **59**(7):561-574.
- [5] Mathew TC. Diversity in the surface morphology of adjacent epithelial cells of the choroid plexus: an ultrastructural analysis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, **301**(1-2):235-239.
- [6] Ingersoll RT, Montgomery EB Jr, Aposhian HV. Central nervous system toxicity of manganese. I. Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal ad-

- ministration of manganese chloride [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1995, **27**(1):106-113.
- [7] Zheng W, Aschner M, Ghersi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, **192**(1):1-11.
- [8] Zheng W, Perry DF, Nelson DL, Aposhian HV. Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals [J]. *FASEB J*, 1991, **5**(8):2188-2193.
- [9] Rubenstein E. Relationship of senescence of cerebrospinal fluid circulatory system to dementias of the aged [J]. *Lancet*, 1998, **351**(9098):283-285.
- [10] Korolainen MA, Nyman TA, Nyssönen P, Hartikainen ES, Pirttilä T. Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease [J]. *Clin Chem*, 2007, **53**(4):657-665.
- [11] Chen RL, Chen CP, Preston JE. Elevation of CSF albumin in old sheep: relations to CSF turnover and albumin extraction at blood-CSF barrier [J]. *J Neurochem*, 2010, **113**(5):1230-1239.

## Injury of chloride manganese to blood cerebrospinal fluid barrier in rats

JING Hai-ming<sup>1,2</sup>, LIU Jiang-zhong<sup>2</sup>, GAO Wen-hui<sup>2</sup>, ZHAO Chao-ying<sup>2</sup>, MA Ling<sup>2</sup>, LI Guo-jun<sup>1,2</sup>  
 (1. School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;  
 2. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning,  
 Beijing Centers for Disease Control and Prevention Beijing Research Center  
 for Preventive Medicine, Beijing 100013, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To investigate the effect of manganese chloride ( $\text{MnCl}_2$ ) on rats' choroid plexus (CP). **METHODS** The rats were ip given  $\text{MnCl}_2$  6 mg(Mn)  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> for 30 d, 90 d or 90 d, followed by 30 d recovery. The samples of serum, cerebrospinal fluid (CSF) and choroid plexus of lateral ventricles were collected at each time point. Serum albumin and CSF albumin were determined by bromocresol green (BCG) and ELISA, respectively. Pathomorphological changes of choroid plexus cells were observed by the light microscopy and electron microscopy. **RESULTS** The levels of CSF albumin and CSF albumin index in  $\text{MnCl}_2$  groups were obviously higher than those in corresponding control groups ( $P < 0.05$ ). The CSF albumin and CSF albumin index in  $\text{MnCl}_2$  30 d group was lower than those of other  $\text{MnCl}_2$  groups ( $P < 0.05$ ), and those in  $\text{MnCl}_2$  90 d group were slightly lower than in  $\text{MnCl}_2$  90 d + 30 d recovery group, but without any statistical difference. Light microscopy and transmission electron microscopy revealed that  $\text{MnCl}_2$  exposure resulted in flattened and shrunken cell layers, cytoplasmic vacuolation, nuclei and chromosome condensation, mitochondrion destruction, shortening of microvilli, and partial disconnection in intracellular junctions between two adjacent epithelial cells. The structural alteration was mild after 30 d treated and moderate in  $\text{MnCl}_2$  90 d. Noticeably, the intracellular damage in  $\text{MnCl}_2$  90 d + 30 d recovery group was even worse than that in  $\text{MnCl}_2$  90 d, suggesting a long-lasting pathological damage even after  $\text{MnCl}_2$  exposure be not ceased. **CONCLUSION**  $\text{MnCl}_2$  can induce pathological changes of choroid plexus, with the characteristics of time-variation and irreversibility. The levels of CSF albumin and CSF albumin index correlate with the extent of injury, and are potentially of great value for assessing BCB impairment after manganese exposure.

**Key words:** manganese; blood-brain barrier; choroid plexus; albumins

**Foundation item:** The project supported by the Outstanding Scientific Leadership for Study Abroad by Beijing Municipal Personnel Bureau(2007-62); Beijing Municipal Health Bureau(2009); and Beijing Health Elite Project (2011)

**Corresponding author:** LI Guo-jun, E-mail: guojunli88@yahoo.com, Tel: (010)64407197

(收稿日期: 2011-01-27 接受日期: 2011-06-30)

(本文编辑: 付良青)