

环境汞污染粮食长期暴露对大鼠脑神经递质的影响

冀秀玲^{1,2}, 金桂文¹, 瞿丽雅³, 程金平¹, 王文华^{1*}

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 东华大学环境科学与工程学院, 上海 200051; 3. 贵州省环境保护科学研究所, 贵阳 550002)

摘要: 为了探讨环境汞污染暴露对公众健康的潜在危害, 采用汞矿地区环境汞污染粮食对大鼠进行长期暴露试验, 研究不同暴露时间节点大鼠脑中神经递质乙酰胆碱(ACh)及其水解酶乙酰胆碱酯酶(AChE)的变化情况, 并以市售上海粮食作对照。结果表明, 环境汞污染粮食暴露 7d 后, 大鼠脑中神经递质 ACh 出现显著升高; 暴露 30d 后仍维持在较高水平。长期暴露 90d 后, 脑中 ACh 出现了显著的回落。AChE 的变化则与之相反。饲喂过程中, 粮食中的硒对汞的蓄积及毒性有一定的拮抗效应。实验结果表明, 实地环境汞污染粮食长期暴露后对大鼠表现出明显的神经毒性作用。环境汞污染长期暴露引起的 ACh 含量下降, AChE 活力上升是否与阿尔茨海默病(AD)有关值得注意。

关键词: 环境汞污染; 长期暴露; 神经递质; 神经毒性

中图分类号: X18, Q523, R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)01-0142-04

Effect of Chronic Exposure by Mercury Contaminated Rice on Neurotransmitter Level Changes in Rat Brain

JI Xiur-ling^{1,2}, JIN Gu-wen¹, QU Li-ya³, CHENG Jin-ping¹, WANG Wen-hua¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Environmental Science & Engineering, Donghua University, Shanghai 200051, China; 3. Guizhou Institute for Environmental Protection, Guiyang 550002, China)

Abstract: In order to survey the potential health risk of environmental exposure by mercury, Sprague-Dawley rats were reared by mercury contaminated rice from mercury mining area. The changes of neurotransmitter acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) in rat brain were examined at different times. The results show that the mercury-contaminated rice significantly increase the content of ACh in rat brain after exposure for 7 days. ACh maintained at a high level even after exposure for 30 days, but decreased significantly after exposure for 90 days. The changes of AChE represented an inverse trend compared with that of ACh. The coexisting selenium in rice exhibited antagonistic effects on both mercury accumulation and toxicity. The findings suggested that neurotoxic effects of environmental mercury contamination had been significantly represented after chronically dietary exposure. Further studies are needed to examine the relationship between the neurotransmitter level changes and the Alzheimer's Disease (AD).

Key words: environmental mercury contamination; chronically exposure; neurotransmitter; neurotoxicity

环境汞污染目前已成为人类生存环境的一大公害。我国是世界上仅次于西班牙和意大利的第三大产汞国, 贵州省则是中国最重要的汞聚集地, 汞的开采冶炼造成严重汞污染。万山汞矿是贵州最大的汞矿, 对万山地区开展的环境化学研究发现, 该地区环境介质以及农作物、植物和动物体中的汞含量, 多数都超过了国家标准及对照地区, 有的超出幅度为 2~3 个数量级^[1]。万山地区的环境汞污染可能已经通过食物链威胁到公众安全, 迫切需要开展环境汞污染对当地居民健康的影响研究。

神经递质是神经信号传递过程中的第一信使, 汞的神经毒性之一可能与其导致神经递质的不可逆释放, 进而影响一系列胞内二、三信使产生各种细胞生理效应有关。乙酰胆碱(ACh)是一种经典的神经递质, 与学习记忆及运动功能紧密相关。研究表明,

ACh 及其水解酶乙酰胆碱酯酶(AChE)都在汞的毒性作用中发挥着作用^[2,3]。目前, 汞的神经递质毒性研究主要集中在实验室化学品汞的毒性研究, 而环境汞污染往往伴随着其它微量元素或污染物同时存在, 环境汞污染的复杂性难以在实验室单一化学品暴露实验中显现出来。为了准确地反映万山地区环境汞污染对公众健康的潜在危害, 本实验利用汞污染地区粮食对大鼠进行不同时间节点的暴露, 研究环境汞污染粮食暴露对大鼠神经递质的影响, 探讨实地环境汞污染的神经毒性作用。

收稿日期: 2005-02-10; 修订日期: 2005-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(20177013, 20077016); 上海交通大学 985 工程资助项目(113516001); 东华大学青年基金资助项目

作者简介: 冀秀玲(1975~), 博士, 主要从事环境毒理学和环境化学方面研究。

* 通讯联系人

1 材料与方法

1.1 动物暴露

实验动物选用 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 清洁级, 体重 $150\text{g} \pm 5\text{g}$, 购于中科院上海实验动物中心. 自由摄食饮水, 光暗比 12h/12h, $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下饲养 1 周后开始暴露. 大鼠分为 3d, 7d, 20d, 30d 和 90d 暴露组, 每组又分为对照和万山 2 组. 对照组喂以上海市场购买当年产大米; 万山组喂以炼矿废水灌溉的实验田中产的大米. 同时添加维生素及微量元素^[4]. 每只大鼠自由进食, 每日更新.

大鼠分别于相应暴露时间点处死. 迅速取出脑组织, 分割为 2 部分, 一部分用于脑汞含量测定, 一部分转入 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于生化指标的测试.

1.2 总汞硒含量的测定

总汞测定由 AMA-254 自动测汞仪完成 (Milestone, Italy). 总硒含量的测定采用原子荧光法, 由 AFS-810 双道原子荧光光度计完成 (吉天, 中国).

1.3 ACh 含量及 AChE 活力的测定

ACh 含量测定采用改进的碱性羟胺法^[5], AChE 活力测定采用改良 Ellman 法^[6].

1.4 统计分析

数据统计采用 t 检验, 各组数据取 $\bar{x} \pm s$.

2 结果与分析

2.1 粮食成分分析

本实验所用粮食采自贵州省万山矿区的试验田, 汞的形态以无机汞为主^[2,7]. 由于万山汞矿为硒汞共生矿, Se 的含量相当丰富. 因此, 本实验室分别测定了粮食中总汞和硒的含量, 结果见表 1.

表 1 不同地区粮食总汞及总硒含量 ¹⁾ / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		
Table 1 T-Hg and T-Se content in rice from different areas/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		
大米样品	上海	万山
总汞含量	0.004 ± 0.001	0.137 ± 0.006
硒含量	0.027 ± 0.003	0.061 ± 0.034

1) 大米样品数 $n = 2$

由表 1 可以得到万山试验田中大米总汞远高于对照区大米. 各地区粮食中所含 Se 与 Hg 的摩尔比分别为: 对照地区 $\text{Se}:\text{Hg} = 4.72$, 万山 $\text{Se}:\text{Hg} = 1.17$.

2.2 污染粮食暴露后大鼠脑中汞的蓄积

污染粮食暴露不同时间大鼠脑中汞的蓄积情况

如图 1 所示.

由图 1 可以看到, 采用实地粮食暴露 7d 后, 万山组大鼠脑中总汞含量显著上升, 与对照组相比有显著性差异 ($p < 0.01$). 随着暴露时间的延长, 万山组脑中总汞含量持续升高, 与对照组相比有显著性差异 ($p < 0.01$).

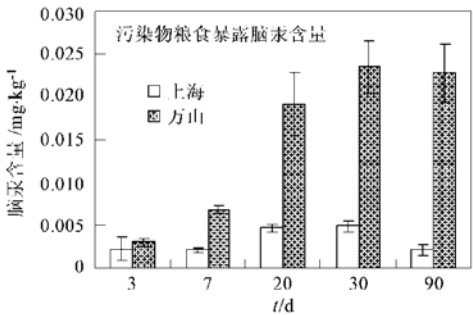


图 1 不同暴露时间大鼠脑中总汞含量 ($n = 6, p < 0.01$)
Fig. 1 T-Hg content in rat brain at different exposure time

2.3 暴露不同时间后大鼠脑中 ACh 及 AChE 的变化

污染区粮食暴露不同时间后大鼠脑中 ACh 含量及 AChE 活力变化情况见表 2.

表 2 不同暴露时间大鼠脑中 ACh 含量及 AChE 活力¹⁾
Table 2 Content of ACh and activity of AChE in rat brain after mercury contaminated rice exposure

t/d	ACh/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		AChE/U	
	上海	万山	上海	万山
3	168.15 ± 22.96	192.38 ± 22.74	1.66 ± 0.15	$1.42 \pm 0.07^*$
7	188.89 ± 9.62	$234.92 \pm 6.73^{**}$	1.72 ± 0.06	$1.43 \pm 0.04^*$
20	186.49 ± 5.41	$285.41 \pm 8.88^{**}$	1.68 ± 0.04	$1.17 \pm 0.09^*$
30	180.78 ± 4.29	$250.34 \pm 6.71^{**}$	1.68 ± 0.12	$1.32 \pm 0.12^*$
90	164.00 ± 3.65	$131.11 \pm 7.70^{**}$	1.78 ± 0.02	$2.16 \pm 0.14^{**}$

1) $n = 6$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

统计分析表明, 经过 3d 暴露后, 万山组大鼠脑中 ACh 含量并无明显变化. 而经过 7d 暴露后, 万山组大鼠脑中 ACh 含量均有明显上升, 随着暴露时间的延长, 20d 暴露组大鼠脑中 ACh 含量持续上升. 与 20d 相比, 暴露 30d 后, ACh 含量稍有回落. 暴露 90d 后, 万山组大鼠脑中 ACh 含量显著下降, 与对照组差异是有显著性.

ACh 水解酶 AChE 活力分析表明, 万山暴露组大鼠脑中 AChE 活力变化趋势与 ACh 含量的变化相反. 经过 3d 暴露后, 万山组大鼠脑中 AChE 活力有显著下降. 随着暴露时间的延长, 20d 暴露组大鼠脑中 AChE 活力持续下降, 暴露 30d 后, AChE 活力有所回升. 暴露 90d 后, 暴露组大鼠脑中 AChE 活

力显著上升,与对照组差异是有极显著性。

3 讨论

实验粮食饲喂大鼠 7d 后,大鼠脑中汞的含量即显著高于对照组($p < 0.01$),表明粮食中的汞已经通过食物在大鼠体内发生了蓄积;随着暴露时间的延长,大鼠脑中汞的蓄积程度显著增加。实地汞污染粮食饲喂 20d, 30d 后,大鼠脑中总汞含量比饲喂 7d 显著增加($p < 0.01$);而长期饲喂 90d 后,大鼠脑中的总汞含量与 30d 相比略有回落。大鼠脑汞含量长期暴露后未出现上升可能是汞在脑中已趋于代谢平衡;而总汞出现回落的趋势则可能与污染粮食中还含有一定量的硒有关。硒的存在一定程度上影响了汞在大鼠脑中的蓄积水平^[8]。

神经递质的实验结果表明,汞污染地区粮食饲喂大鼠 3d 或 7d 后,在不同的暴露时间点都引起了大鼠脑组织中 ACh 含量和 AChE 活力的变化。万山组大鼠脑中 ACh 含量出现了先升高后降低的变化趋势;而 AChE 活力的变化趋势则与之相反。以往的研究表明,低汞蓄积将有助于乙酰胆碱的释放,而高汞水平蓄积则会抑制乙酰胆碱释放^[9,10]。但从大鼠体内汞的蓄积情况看,20d 和 30d 暴露后,大鼠脑中汞含量与对照组相比已经极显著升高,接近最高点;而对应的脑中 ACh 含量并未受到抑制,反而出现显著升高,这种现象表明,硒可能在汞的毒性作用中起到作用。汞主要通过神经元中与胆碱转运体蛋白、乙酰胆碱受体蛋白、细胞离子通道蛋白、胆碱酯酶等上面的巯基结合从而影响乙酰胆碱神经递质的正常生理功能,而硒的存在,在一定程度上削弱了这种影响。硒属于氧族元素,其性质与硫接近,在动植物体内,汞可以和硒结合^[11,12]。因此,当含硒的汞污染大米食进入动物体内后,汞与体内巯基的结合在一定程度上受到抑制。

与 30d 以及之前的各暴露时间点结果相比,90d 长暴露后万山组大鼠脑中 ACh 含量出现明显回落,而 AChE 活力出现显著上升。短期、低汞剂量暴露时,汞对乙酰胆碱的影响是刺激作用,而长时间的刺激结果将耗尽细胞内积蓄的乙酰胆碱,从而导致胆碱能神经递质功能的全面衰退。ACh 是中枢胆碱能系统重要的神经递质,研究证实,其含量的高低与学习记忆能力呈一定的正相关。汞污染粮食长暴露 90d 后引起的大鼠 ACh 神经递质下降, AChE 活力上升的现象类似阿尔茨海默病(AD)患者症状。研究表明 AD 患者脑中 AChE 活性显著升高, ACh 含量

不足,学习记忆能力下降, AChE 活力抑制剂可以改善这种状况^[13,14]。本研究发现,长期汞污染粮食暴露后,大鼠脑内也出现了 ACh 含量下降, AChE 活力升高的现象。ACh 含量的下降一方面是由于 AChE 活性的异常增高所引起,另一方面也可能是神经元受损,物质代谢功能降低,生成 ACh 减少所致。目前,铝被广泛地认为是诱导 AD 的诱因^[15,16],而近来的研究显示,阿尔茨海默病患者脑中汞含量远高于正常人群,并且汞能诱导阿尔茨海默病患者脑中神经纤维缠结(neurofibrillary tangles)的形成,表明汞与阿尔茨海默病关系密切^[17,18]。本课题利用基因芯片技术对万山组长期暴露大鼠脑基因的表达变化进行了研究,已有结果显示大鼠脑中学习记忆及阿尔茨海默病相关功能基因表达变化显著。

4 结论

实地环境汞污染粮食暴露初期,粮食中的硒元素对汞的毒性起到一定的抑制作用。而长期的汞污染粮食暴露对大鼠表现出明显的神经毒性作用。汞污染粮食长期暴露引起大鼠脑中的 ACh 含量下降, AChE 活力上升是否与阿尔茨海默病(AD)有关值得关注。

参考文献:

- [1] Horvat M, Nolde N, Fajon V, *et al.* Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2003, **304** (1-3): 231~ 256.
- [2] Ji X L, Yang L, Shen Z M, *et al.* Neurotransmitter level changes in domestic ducks (Shaoxing duck) growing up in typical mercury contaminated area in China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, **17** (2): 256~ 258.
- [3] 杨柳. 环境汞污染对动物某些神经递质影响的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2003.
- [4] Semiramis M A, Domenea H R, Torin J A. Dietary zinc improves and calcium depresses growth and zinc uptake in rats fed rice bran [J]. *Nutrition Research*, 2001, **21**: 1493~ 1500.
- [5] 鲁祖荪, 叶菲, 都本叶. 碱性羟胺比色法测定全血乙酰胆碱 [J]. *临床检验杂志*, 1993, **10** (2): 84~ 85.
- [6] 薛寿征, 屈家瑛, 周志俊. 全血胆碱酯酶活性的硫代乙酰胆碱 B 连硫代双硝基苯甲酸比色测定法研究 [J]. *工业卫生与职业病*, 1991, **17** (6): 362~ 364.
- [7] 瞿丽雅. 贵州汞污染防治研究 [M]. 贵州: 贵州人民出版社, 2004.
- [8] Bjerregaard P, Andersen B W, Rankin J C. Retention of methyl mercury and inorganic mercury in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (W): effect of dietary selenium [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, **45** (2-3): 171~ 180.

- [9] Mirzoian A, Luetje C W. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury[J]. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002, **302**: 560~ 567.
- [10] Suresh A, Sivaramakrishna B, Victoriamma, P C, *et al.* Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc[J]. Biochem. Int., 1992, **26**: 367~ 375.
- [11] Yoneda S, Suzuki K T. Detoxification of Mercury by Selenium by Binding of Equimolar Hg-Se Complex to a Specific Plasma Protein[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1997, **143** (2): 274~ 280.
- [12] Yoneda S, Suzuki K T. Equimolar Hg-Se Complex Binds to Selenoprotein P [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, **231** (1, 3): 7~ 11.
- [13] Lojkowska W, Ryglewicz D, Jedrzejczak T, *et al.* The effect of cholinesterase inhibitors on the regional blood flow in patients with Alzheimer' s disease and vascular dementia[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2003, **216** (1): 119~ 126.
- [14] Dane R Liston, Jann A Nielsen, *et al.* Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer' s disease[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, **486** (1): 9~ 17.
- [15] Flaten T P. Aluminium as a risk factor in Alzheimer' s disease, with emphasis on drinking water[J]. Brain Research Bulletin, 2001, **55** (2): 187~ 196.
- [16] Polizzi S, Pira E, Ferrara M, *et al.* Neurotoxic Effects of Aluminium Among Foundry Workers and Alzheimer' s Disease [J]. NeuroToxicology, 2002, **23** (6): 761~ 774.
- [17] Wenstrup D, Ehmann W D, Markesbery W R. Trace element imbalances in isolated subcellular fractions of Alzheimer' s disease brains[J]. Brain Research, 1990, **533** (1): 125~ 131.
- [18] Ely J T A. Mercury Induced Alzheimer' s Disease: Accelerating Incidence? [J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2001, **67**: 800~ 806.