

牛磺酸对甲基汞致大鼠脑氧化损伤的保护作用

李乐慧, 徐兆发, 刘巍, 奉姝, 杨天瑶, 李静慧

摘要: [目的] 探讨甲基汞致大鼠脑氧化损伤及牛磺酸对氧化损伤的保护作用。[方法] 将 24 只健康清洁级 Wistar 大鼠按体重随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别为对照组、低剂量染汞组、高剂量染汞组和牛磺酸干预组。周一至周五每天进行染毒, 对照组腹腔注射生理盐水, 低剂量染汞组腹腔注射 $4 \mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞, 高剂量染汞组和牛磺酸干预组腹腔注射 $12 \mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞; 每周一、三、五染毒前 2 h 进行预处理, 对照组、低剂量染汞组和高剂量染汞组皮下注射生理盐水, 牛磺酸干预组皮下注射 1 mmol/kg 的牛磺酸; 连续进行 4 周, 最后一次染毒后, 处死大鼠。取大脑皮质测定: 活性氧 (ROS)、巯基、羰基、丙二醛 (MDA) 的含量, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px) 的活性及细胞凋亡率。[结果] 与对照组比较, 低、高汞组大鼠的体重增长幅度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ROS 分别是其 1.8 和 3.9 倍 (均 $P < 0.01$); SOD 和 GSH-px 的活性均降低; 巯基的含量降低; 羰基的含量升高; MDA 增加; 细胞凋亡率分别升高 3.4 和 10.0 倍。牛磺酸干预组与高剂量染汞组比较, ROS 的生成量降低了 17%; SOD、GSH-px 的活性有不同程度的升高; 巯基、羰基和 MDA 的含量也有不同程度的改变; 细胞凋亡率为高汞组的 44%。[结论] 甲基汞可导致脑氧化损伤, 牛磺酸对甲基汞所致氧化损伤具有一定的保护作用。

关键词: 牛磺酸; 甲基汞; 氧化损伤; 活性氧; 凋亡

Protective Effects of Taurine on Methylmercury-Induced Oxidative Damage LI Yue-hui, XU Zhao-fa, LIU Wei, FENG Shu, YANG Tian-yao, LI Jing-hui (Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Liaoning 110001, China). Address correspondence to XU Zhao-fa, E-mail: zfxu@mail.cmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the effects of methylmercury on oxidative damage in cerebrum of rats and the protective effects of taurine on the oxidative damage. [Methods] Twenty-four rats were randomly divided into four groups by weight: control (saline), low methylmercury ($4 \mu\text{mol/kg}$), high methylmercury ($12 \mu\text{mol/kg}$), and taurine intervention groups ($4 \mu\text{mol/kg}$ methylmercury + 1 mmol/kg taurine). Exposure started from Monday to Friday by intraperitoneal injection and lasted four weeks. Two hours before the exposure on every Monday, Wednesday, and Friday, the control, low methylmercury, and high methylmercury groups were subcutaneously injected with 0.9% sodium chloride, and the taurine group was subcutaneously injected with 1 mmol/kg taurine. Twenty-four hours after the last exposure, the rats were neutralized, and the cerebral cortices were taken for detecting contents of reactive oxygen species (ROS), sulfhydryl, carbonyl, malondialdehyde (MDA), activities of super oxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and apoptosis rate. [Results] The body weights of animals increased less in the low and the high methylmercury group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) respectively than that in the control group. The contents of ROS in the low and the high methylmercury groups were 1.8 and 3.9 times respectively of the control group (both $P < 0.01$); the activities of SOD and GSH-Px decreased, the contents of sulfhydryl decreased, the contents of carbonyl and MDA increased, and the apoptosis rates increased 3.4 and 10.0 times respectively. Compared with the high methylmercury group, the content of ROS of the taurine group reduced by 17%, the activities of SOD and GSH-Px increased, the content of sulfhydryl, carbonyl, and MDA also changed, and the apoptosis rate was 44% of reported in the high methylmercury group. [Conclusion] Methylmercury can lead to oxidative damages in rat cerebral cortices, and taurine shows protective effects on methylmercury-induced oxidative damages.

Key Words: taurine; methylmercury; oxidative damage; reactive oxygen species; apoptosis

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0111

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81172631)

[作者简介] 李乐慧 (1985—), 女, 硕士生; 研究方向: 重金属中毒机制及防治; E-mail: cmuliyuehui@163.com

[通信作者] 徐兆发, E-mail: zfxu@mail.cmu.edu.cn

[作者单位] 中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 110001

甲基汞 (methylmercury) 是一种常见的环境污染物^[1], 能够引起神经行为的损伤, 甲基汞进入人体后分布于多种组织^[2], 中枢神经系统是其最敏感的靶器官^[3], 尤其是暴露于脑发育的初级阶段^[4], 人类主要是通过食用海产品暴露于甲基汞^[5]。暴露于甲基汞的人群主要表现为神经系统的疾病, 包括一系列感觉、认知和运动障碍^[6-7]。有关甲基汞所致神经毒性的机制目

前还没有明确的解释,有研究表示与氧化损伤有关。

牛磺酸(taurine)是一种存在于大多数哺乳动物组织内的 β -氨基酸,在脑内的含量丰富、分布广泛,能明显促进神经系统的生长发育和细胞增殖、分化,在脑神经细胞发育过程中起重要作用。在体内具有抗凋亡、神经保护、抗氧化和调节渗透压等作用^[8]。本实验室前期试验研究显示,牛磺酸对甲基汞诱导的谷氨酸兴奋性损伤具有防护作用。本实验探讨甲基汞致大鼠脑氧化损伤的相关指标以及酶的影响,测定牛磺酸干预后相关指标、酶活性的变化,观察牛磺酸对甲基汞诱导的氧化损伤是否具有防护作用,以为甲基汞中毒的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),F732 型测汞仪(上海华光仪器仪表厂),高速分散均质机(上海标本模型厂),高速离心机(上海医用分析仪器厂),KS-150 型超声波细胞粉碎机(宁波科生仪器厂),氯化甲基汞(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司),牛磺酸(北京奥博星生物技术责任有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性以及巯基、羰基、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒均由南京建成生物工程研究所有限公司提供。其他均为国产试剂。

1.2 动物染毒及干预物质剂量的选择

根据查阅文献,结合本实验室前期试验及预实验,甲基汞浓度为 $4\mu\text{mol/kg}$ 时能观察到相关效应, $12\mu\text{mol/kg}$ 是指在不导致动物死亡的前提下,神经损伤效应最显著的剂量。而牛磺酸在 1mmol/kg 时能够观察到指标的有效改善。

1.3 动物分组及染毒

选择健康清洁级 Wistar 大鼠 24 只,体质量(180 ± 10)g,雌雄各半,由中国医科大学实验动物部提供,实验动物许可证号为 SYXK(辽)2008-0005。正式实验前适应性饲养 1 周。将实验动物按体质量随机分成 4 组,每组 6 只,分别为对照组、低剂量甲基汞染毒组、高剂量甲基汞染毒组和牛磺酸干预组。周一至周五每天进行染毒:对照组腹腔注射生理盐水,低剂量甲基汞染毒组腹腔注射 $4\mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞,高剂量甲基汞染毒组和牛磺酸干预组腹腔注射 $12\mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞。每周一、三、五染毒前 2h 进行预处理:对照组、低剂量甲基汞染毒组和高剂量甲基汞染毒组皮下注射生理盐水,牛磺酸干预组皮下注射 1mmol/kg 的牛磺酸。连续 4 周,注射容量均为 5mL/kg 。

1.4 样本采集与测定指标及方法

最后一次染毒 24h 后,大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,心脏放血,断头在冰浴下迅速分离大脑皮质,制备匀浆,按照试剂盒说明书测定 SOD、GSH-Px 的活性以及巯基、羰基、MDA 含量。制备单细胞悬液,流式细胞仪测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)和细胞凋亡率。

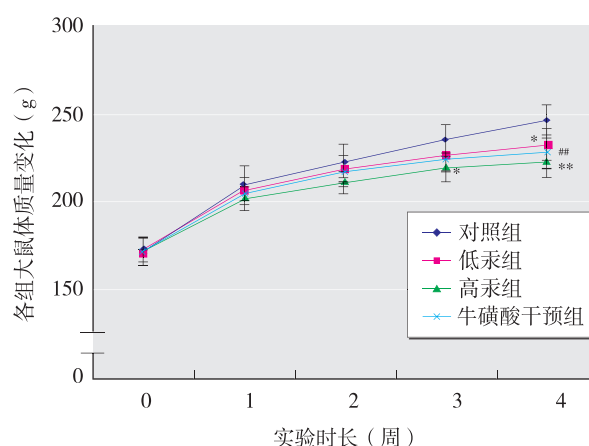
1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析进行组间差异的比较,两组间比较用 q 检验(Students-Newman-Keuls, SNK)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量变化和一般情况

由图 1 可见,与对照组比较,随着染汞浓度的增加,低汞组和高汞组大鼠体质量增长幅度降低($P<0.05$, $P<0.01$);牛磺酸干预后,该组大鼠体质量较高汞组明显增长($P<0.01$)。染汞后,随着时间增加,大鼠出现食欲减退、活动减少、皮毛粗糙伴脱落、毛色暗淡、嗜睡现象。高汞组大鼠易被激惹,出现步态不稳等体征;牛磺酸干预组与高汞组比较,大鼠嗜睡现象较少,活动量稍多。

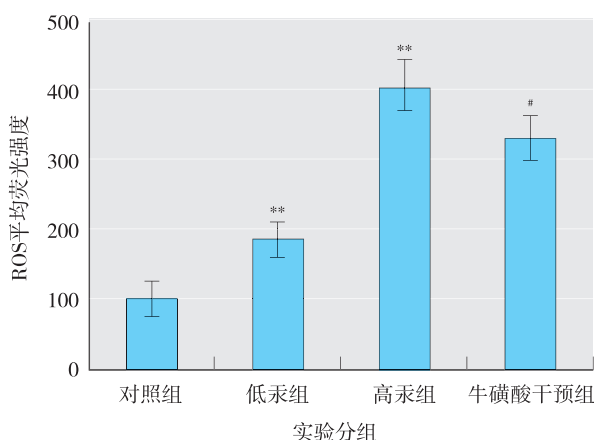


[注]与对照组比较,*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。与高汞组比较,##: $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠体质量变化($n=6$)

2.2 ROS 的含量

结果显示,低汞组和高汞组的 ROS 含量明显增高,分别是对照组的 1.8 倍和 3.9 倍($P<0.01$);与高汞组比较,牛磺酸干预组中 ROS 含量降低 17%($P<0.05$),见图 2。



[注]与对照组比较,**: $P<0.01$ 。与高汞组比较, #: $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠脑皮质中 ROS 的含量($n=6$)

2.3 大鼠脑皮质中 SOD 和 GSH-Px 的活性

与对照组比较,高汞组 SOD、GSH-Px 活性明显降低($P<0.01$)。与高汞组比较,牛磺酸干预组的 SOD 和 GSH-Px 活性呈现上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 大鼠脑皮质中 SOD 和 GSH-Px 的活性 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg pro)	GSH-Px(U/mg pro)
对照组	73.17 ± 14.89	20.59 ± 4.91
低汞组	58.42 ± 6.26*	17.47 ± 4.48
高汞组	30.46 ± 4.55**	10.46 ± 3.05**
牛磺酸干预组	42.69 ± 8.90#	15.78 ± 4.34#

[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。与高汞组比较, #: $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠脑皮质中巯基、羰基及 MDA 的含量

由表 2 可见, 与对照组比较, 低汞组和高汞组巯基含量均明显降低 ($P<0.01$); 羰基和 MDA 含量增高 ($P<0.05$)。与高汞组比较, 牛磺酸干预后, 三个指标都得到明显改善, 其差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

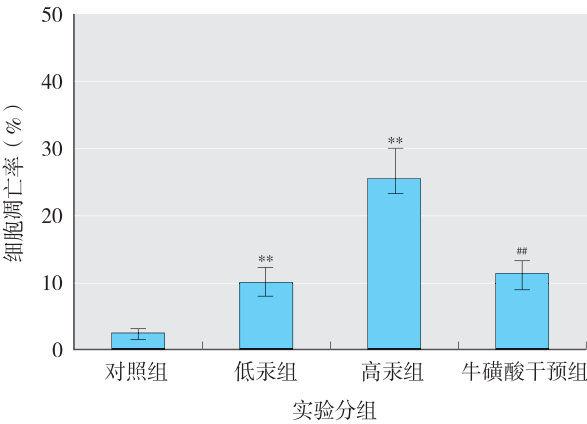
表 2 大鼠脑皮质中巯基、羰基、MDA 含量 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	巯基($\mu\text{mol/g pro}$)	羰基(nmol/g pro)	MDA(nmol/mg pro)
对照组	47.39 ± 3.82	2.25 ± 0.60	2.26 ± 0.16
低汞组	36.60 ± 3.74**	3.12 ± 0.65*	2.63 ± 0.17*
高汞组	27.70 ± 4.33**	6.19 ± 0.98**	3.72 ± 0.22**
牛磺酸干预组	39.23 ± 6.91##	4.24 ± 0.23##	2.83 ± 0.35##

[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。与高汞组比较, ##: $P<0.01$ 。

2.5 大鼠细胞凋亡率

由图 3 可见, 与对照组比较, 低汞组和高汞组的细胞凋亡率分别升高 3.4 倍和 10.0 倍 ($P<0.01$); 与高汞组比较, 牛磺酸干预组中细胞凋亡率显著下降, 为其 44%, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。



[注] 与对照组比较, **: $P<0.01$ 。与高汞组比较, ##: $P<0.01$ 。

图 3 各组大鼠细胞凋亡率 (n=6)

3 讨论

甲基汞是一种具有生物富集作用和生物放大作用的严重危害人类健康的环境污染物, 具有强烈的神经毒性作用。自然界的汞可被水生微生物通过甲基化转化为甲基汞^[9], 是自然界中最具毒性的汞的一种存在形式, 它能够在生物体内富集, 其浓度在大型食肉物种的水生食物链顶端达到最高^[10]。甲基汞能够以原形在细胞中蓄积, 并对神经细胞造成一系列的损害。

由各组大鼠体质量的变化可见, 随着染汞剂量的增加, 细

胞内 ROS 的含量逐渐升高, 甲基汞进入机体后与巯基结合, 以半胱氨酸-甲基汞复合物 (Cys-MeHg) 的形式存在, 通过中性氨基酸运转系统, 透过血脑屏障, 进入脑组织, 侵入富含类脂质的脑细胞从而产生其特有的高神经毒性。甲基汞与含有巯基的呼吸链复合酶以及线粒体肌酸激酶结合后, 破坏线粒体的功能^[11-12]。由于这些复合物或者酶的抑制作用, 促使线粒体去极化和肿胀, 导致不完全氧化产物和 ROS 生成。由于 ROS 的过量产生, 引发甲基汞进一步攻击线粒体的亲核中心和其他亚细胞间隙加剧其神经毒性。

甲基汞还是一种亲电子剂, 与亲核物质优先反应, 其能与生物体内含巯基和硒醇基的两类亲核物质结合。其中含有硒醇基的酶类与甲基汞的亲合力更高^[13], 所以甲基汞除了与特定的含巯基蛋白结合外还以另一种稳定的方式结合于硒醇蛋白, 致使脑内抗氧化酶活性降低, 从而抑制其抗氧化能力的发挥。例如 SOD 和 GSH-Px, 当暴露于甲基汞后, 活性会受到抑制, 使其清除自由基的能力下降, 导致 ROS 在体内积累, 对细胞造成一系列的损伤。

神经组织内富含多不饱和脂肪酸, 它们对 ROS 攻击特别敏感, ROS 可攻击蛋白质、脱氧核糖核酸和脂质膜, 破坏细胞的功能和完整性。过量的 ROS 还可以诱导细胞的凋亡。

ROS 攻击蛋白质, 引起氨基酸残基结构和构象的改变, 发生肽键断裂、聚合和交联。在这些蛋白质的氧化损伤反应中, 均会有蛋白质羰基的产生和巯基的减少, 而且蛋白质羰基的产生是蛋白质分子被自由基氧化修饰的一个重要标记。通过这一普遍性特征来测定组织中蛋白质羰基和巯基的含量, 以此反映机体蛋白质氧化损伤的情况。由于生物膜富含多不饱和脂肪酸, 易受 ROS 的攻击引起脂质过氧化, 而 MDA 就是其产生的脂质过氧化物之一, 其含量的多少能够反映脂质过氧化的速率和强度^[14]。

本研究结果表明, 由甲基汞所诱发的脑氧化损伤, 在牛磺酸干预后 ROS 明显减少, 推测牛磺酸清除了自由基, 减轻蛋白质和脂质的过氧化损伤程度, 抑制甲基汞致抗氧化酶活性的降低, 对此结果说明牛磺酸对甲基汞致大鼠脑氧化损伤具有一定的防护作用。本研究尚未深入探究牛磺酸是通过什么机制清除自由基以及怎样抑制酶活性的机理, 故对此还有待进一步深入研究。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] ATCHISON WD, HARE M F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity [J]. FASEB J, 1994, 8 (9): 622-629.

[2] ZAREBA G, CERNICHIARI E, HOJO R, et al. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methylmercury [J]. J Appl Toxicol, 2007, 27 (5): 511-518.

[3] JOHANSSON C, CASTOLDI A F, ONISHCHENKO N, et al. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development [J]. Neurotox Res, 2007, 11 (3/4): 241-260.

[4] COSTA LG, ASCHNER M, VITALONE A, et al. Developmental

Nature 中描述到, IGF-II 具有巩固记忆和防止遗忘的生物学作用, 能够促进细胞的增殖、分化, 减少细胞的程序性死亡。本研究显示, 模型组仔鼠的 IGF-II mRNA 表达量与对照组比较, 差异具有统计学意义, 模型组仔鼠 IGF-II mRNA 表达量低于对照组。原因在于海马 IGF-II 发挥学习记忆功能需要学习记忆信号转导通道中增强子结合蛋白 β (C/EBP β) 的协助, 而 C/EBP β 则是记忆巩固中必不可少的因子, IGF-II 含量降低, C/EBP β 也会下降, 功能降低, 致使学习记忆能力下降^[15]。这也可作为今后由于多种原因导致学习记忆损伤的干预提供一定的思路。而有研究报道, 在应激加强训练后的大鼠脑内海马区注射 IGF-II, 能够帮助大鼠学习记忆能力的恢复^[14]。

综上所述, 孕前慢性应激后仔鼠胚胎期发育减慢, 血浆皮质酮升高, 且空间学习记忆能力下降, 同时, 海马中 IGF-II 的表达也显著降低。相关性分析结果共同说明孕前受慢性应激后子代学习记忆能力下降可能与其脑内 IGF-II 表达的上调及体内皮质酮升高有关系。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] KAPOOR A, KOSTAKI A, JANUS C, et al. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor[J]. Behav Brain Res, 2009, 197(1): 144-149.
- [2] FOSTER J C, GARBERAND J A, DURLAK J A. Current and past maternal depression, maternal interaction behaviors, and children's externalizing and internalizing symptoms[J]. Child Psychol, 2008, 36(4): 527-537.
- [3] DIKKES P, B JAFFE D, GUO W H, et al. IGF-2 knockout mice are resistant to kainic acid-induced seizures and neuroe generation[J]. Brain Res, 2007, 1175: 85-95.
- [4] HAO L Y, HAO X Q, LI S H, et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats[J].

Neuroscience, 2010, 166(3): 763-770.

- [5] SADLER T R, NGUYEN P T, YANG J, et al. Antenatal maternal stress alters functional brain responses in adult offspring during conditioned fear[J]. Brain Res, 2011, 1385: 163-174.
- [6] 李炎谈, 向心力, 段涛. 孕期应激及对子代 HPA 轴的影响及机制探讨[J]. 同济大学学报, 2013, 4(34): 116-118.
- [7] WILLNER P, WILKES M, ORWIN A. Attributional style and perceived stress in endogenous and reactive depression[J]. Journal of Affective Disorders, 1990, 18(4): 281-287.
- [8] LIU X H, QIAN L J, GONG J B, et al. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in cardiomyocytes from chronic stressed rat[J]. Proteomics, 2004, 4(10): 3167-3176.
- [9] 杨来启, 吴兴曲, 胡淑芳, 等. 慢性应激大鼠脑边缘系统病理应激效应研究[J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(5): 490-491.
- [10] 张清林, 樊勇, 郭晶, 等. Wistar 大鼠的生殖功能和胎儿发育的正常指标[J]. 毒理学杂志, 2007, 4(21): 327.
- [11] GRIFFIN W C 3RD, SKINNER H D, SALM A K, et al. Mild prenatal stress in rats is associated with enhanced conditioned fear[J]. Physiol Behav, 2003, 79(2): 209-215.
- [12] KAPOOR A, KOSTAKI A, JANUS C. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor[J]. Behav Brain Res, 2009, 197(1): 144-149.
- [13] GLOVER V, O'CONNOR T G, O'DONNELL K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2010, 35(1): 17-22.
- [14] CHEN D Y, STERN S A, GRACIA-OSTA A. et al. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement[J]. Nature, 2011, 469(7331), 491-498.
- [15] AMARGER V, NGUYEN M, LAERE A S, et al. Comparative sequence analysis of the INS-IGF2-H19 gene cluster in pigs[J]. Mammalian Genome, 2002, 13(7): 388-398.

(收稿日期: 2013-12-29)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 洪琪)

(上接第 471 页)

- neuropathology of environmental agents[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 87-110.
- [5] CLARKSON T W, MAGOS L, MYERS G J. The toxicology of mercury — current exposures and clinical manifestations[J]. N Engl J Med, 2003, 349(18): 1731-1737.
- [6] ETO K. Minamata disease[J]. Neuropathology, 2000, 20(Suppl): S14-19.
- [7] ETO K, MARUMOTO M, TAKEYA M. The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease)[J]. Neurotoxicology, 2010, 30(5): 471-479.
- [8] SONG N Y, SHI H B, LI C Y, et al. Interaction between taurine and GABAA/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus[J]. Brain Res, 2012, 1472: 1-10.
- [9] COMPEAU G C, BARTHA R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50(2): 498-502.
- [10] YOSHIDA E, TOYAMA T, SHINKAI Y, et al. Detoxification of

methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells[J]. Chem Resin Toxicol, 2011, 24(10): 1633-1635.

- [11] GLASER V, LEIPNITZ G, STRALIOTTO M R, et al. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury[J]. Neurotoxicology, 2010, 31(5): 454-460.
- [12] GLASER V, NAZARI E M, MÜLLER Y M, et al. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex[J]. Int J Dev Neurosci, 2010, 28(7): 631-637.
- [13] KHAN M A, ASADUZZAMAN A M, SCHRECKENBACH G, et al. Synthesis characterization and structures of methylmercury complexes with selenoamino acids[J]. Dalton Trans, 2009(29): 5766-5772
- [14] CHTOUROU Y, FETOUI H, SEFI M, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats[J]. Biometals, 2010, 23(6): 985-996.

(收稿日期: 2014-03-06)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)