

# 甲基汞暴露对出生后大鼠学习记忆及 NMDA 受体表达的影响

王欣梅, 刘雯君, 周宜开

**摘要:** [目的] 研究甲基汞暴露对出生后不同生长期大鼠学习记忆能力及 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 受体 mRNA 水平表达的影响。[方法] 将出生后大鼠随机分组, 即 5 mL/kg 生理盐水组和 5 mg/kg 氯化甲基汞 (MMC) 染毒组, 其中染毒组按生后不同生长期分 4 个亚组, 即 PND7、PND14、PND28 和 PND60 组, 连续 7 d 灌胃染毒。采用 Morris 水迷宫试验检测大鼠学习记忆功能的改变, 用原子荧光光度计检测脑组织汞含量、用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 特异性扩增受体 NMDA 的 2A、2B、2C 亚基, 半定量分析 PCR 产物凝胶电泳结果。[结果] 各染毒亚组在染毒后脑组织中汞含量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 水迷宫试验后, PND28 皮质组织及 PND60 脑组织中汞含量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); Morris 水迷宫试验结果显示, PND7、PND14 染毒大鼠水迷宫测试潜伏期明显长于对照组 ( $P < 0.01$ ); PND14 染毒亚组海马和皮质中 *NR2A* mRNA 的表达明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ); PND14 染毒亚组海马中 *NR2B* mRNA 表达明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ); PND14 染毒亚组海马和皮质以及 PND28 亚组皮质中 *NR2C* mRNA 表达明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。[结论] 甲基汞对出生后 1、2 周的大鼠学习记忆功能有明显影响, 其影响与脑组织 NMDA 受体 2 亚基 mRNA 表达变化有关。

**关键词:** 甲基汞; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体; 学习记忆

**Effects of Postnatal Exposure to Methylmercury on Learning, Memory and Expression of NMDA Receptor of Rats** WANG Xin-mei, LIU Wen-jun, ZHOU Yi-kai (Key Laboratory of Environment and Health of Ministry of Education, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China). Address correspondence to ZHOU Yi-kai, E-mail: zhouyk@mails.tjmu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To study the effects of postnatal exposure to methylmercury on learning, memory and the expression of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor mRNA in rats. [Methods] The rats treated with 5 mg/kg methylmercury chloride (MMC) were taken as MMC-treated group and those with 5 mL/kg sodium chloride solution as control group, by oral for 7 consecutive days. The MMC-treated group was subdivided by different postnatal periods (PND7, PND14, PND28 and PND60) and tested for learning and memory with Morris water maze. The concentration of mercury was checked by atomic fluorescence spectrometry (AFS). Expression of NMDA receptor 2A, 2B and 2C subunits were measured by semi-quantitative reverse transcript polymerase-chain reaction (RT-PCR). [Results] Mercury concentrations in both hippocampus and cerebral cortex were elevated significantly in the MMC-treated group ( $P < 0.01$ ); while the level of mercury in cortex of PND28 and both cortex and hippocampus of PND60 was significantly higher in comparison with that of the control ( $P < 0.01$ ). The latency of PND7 and PND14 MMC-treated rats in water maze was much longer than that of the control ( $P < 0.01$ ). The levels of *NR2A* mRNA were significantly decreased in both hippocampus and cortex of PND14 subgroup ( $P < 0.05$ ); the levels of *NR2B* mRNA were significantly reduced in hippocampus of PND14 subgroup ( $P < 0.01$ ); and an increment of *NR2C* mRNA was observed in hippocampus of PND14 and in cortex of PND14 and PND28 subgroups ( $P < 0.01$ ). [Conclusion] The first two weeks after birth is critical to methylmercury exposure, which would result in the impairment of learning and memory ability for life span. The altering expression of *NR2* subunits is an influencing factor.

**Key Words:** methylmercury; NMDA receptor; learning and memory

甲基汞是公认的具有极强神经毒性的物质, 人们大多因为食用了被甲基汞污染的食物而发生甲基汞中毒。妊娠期甲基汞暴露对胎儿及出生后婴儿神经系统发育的影响一直备受关注<sup>[1-2]</sup>, 然而出生早期婴儿仍然可以通过母乳接触甲基汞,

而该时期同样是中枢神经系统 (CNS) 发育的关键时期。*N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体属于离子型谷氨酸受体, 是许多中枢突触产生去极化信号的主要基础, 参与多种形式的神经元可塑性改变, 可导致学习、记忆、行为障碍, 在大脑的发育和成熟过程中扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。NMDA 可能是甲基汞造成学习记忆损伤的关键点之一, 为此, 本项目拟通过研究低剂量甲基汞急性暴露对出生后不同生长期大鼠学习记忆及 NMDA 受体表达的影响, 从而进一步探讨甲基汞中毒的机制。

[作者简介] 王欣梅 (1984—), 女, 博士; 研究方向: 环境医学监测新技术; E-mail: wangzizi33@163.com

[通信作者] 周宜开教授, E-mail: zhouyk@mails.tjmu.edu.cn

[作者单位] 华中科技大学同济医学院公共卫生学院教育部环境与健康重点实验室, 湖北 武汉 430030

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

氯化甲基汞溶液,由生理盐水与氯化甲基汞配制而成,优纯(GR)级,日本和光纯药株式会社提供;汞标准应用液为国家标准物质研究中心提供的汞标准储备液;Trizol,美国Invitrogen公司;M-MLV 逆转录酶,美国Promega公司;AFS-920 双道原子荧光光度计,北京吉天仪器公司;Morris 水迷宫分析系统(Ethovision 系统),荷兰Noldus公司;凝胶成像分析系统,法国Vilber Lourant公司;成年健康Sprague-Dawley(S-D)大鼠,体重200~250g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

### 1.2 动物模型建立及分组

动物饲养温度为(22±2)℃,动物房内清洁无尘,定期更换垫料,饲料为华中科技大学同济医学院动物实验中心提供的清洁饲料。实验动物按1:1同笼,次晨检测雌鼠有无阴栓,发现阳性者为受孕。仔鼠出生1d为PND1,根据体重将各笼仔鼠控制为8只,随机分为对照组和染毒组,其中染毒组按出生后不同生长时期分4个亚组,即PND7、PND14、PND28、PND60组。每个亚组15只仔鼠。

染毒组( $n=15$ )和对照组( $n=15$ )根据体重分别给予5mg/kg氯化甲基汞溶液和5mL/kg的生理盐水(0.9%,体积分数),分别于PND7、PND14、PND28、PND60连续7d灌胃。各组在连续7d染毒后第3天随机取10只进行取材(汞含量测定时从10只中随机取6只脑组织进行测试,其余4只备用),另外5只喂养至成年(PND69)进行水迷宫测试后再处死取材。

### 1.3 样本处理

分别取染毒结束后第3天( $n=6$ )及水迷宫测试结束后( $n=5$ )的大鼠脑组织,迅速剥离皮质和海马,准确称重编号,暂放入-20℃冰柜,速转移至-80℃冰箱保存,待测。

### 1.4 原子荧光光度计检测汞含量

为保证染毒建模成功及观测脑组织汞含量随时间的改变,采用原子荧光光度计检测脑组织汞含量。将组织样本于聚四氟乙烯密闭消化罐中加入1mL硝酸,140℃消化1.5h,冷却后,转移至25mL比色管,并用去离子水定容至25mL,摇匀待测。仪器条件:光电倍增管副高压250V,灯电流40mA,原子化器温度200℃,原子化器高度9mm,载气流速400mL/min,屏蔽气流速800mL/min。测量方法为标准曲线法。

### 1.5 Morris 水迷宫试验

水迷宫为直径180cm,高度60cm的圆形水池,水池分为4个象限,水面高于平台1.5cm,水温控制在(26±1)℃,加入30mL墨水使平台不可见,迷宫外实验室摆设相对固定。试验共进行5d,固定为每日9:00至14:00。前4d为训练,每次训练前将大鼠运至测试室经30min待其状态稳定后开始训练。每日训练3次,分别从象限II、I、IV将大鼠面朝池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(潜伏期),每次游泳时间限定在60s,超过60s则引导其自行爬上平台,并在平台停留30s,帮助其记住平台的方位,每次训练之间间隔5min以上。第5天记录大鼠寻找平台的潜伏期为其最终成绩。

### 1.6 NR2A、NR2B、NR2C mRNA 表达检测

#### 1.6.1 总 RNA 提取及逆转录 用 Trizol 法抽提组织中的总

RNA。具体步骤为:分别取海马和皮质组织各50mg,加入1mL Trizol 匀浆,冰上静置5min;将匀浆液移入离心管,加入预冷的氯仿0.2mL/mL Trizol,充分混匀,冰上静置3min。4℃,12000×g,离心15min。取上清,加入预冷异丙醇0.5mL/mL Trizol,颠倒混匀,冰上静置10min。4℃,12000×g,离心10min。弃上清,取沉淀,加入预冷75%(体积分数)乙醇1mL/mL Trizol,漂洗沉淀。75%(体积分数)乙醇用0.1%(体积分数)二乙基焦碳酸酯(DEPC)水配制。4℃,7500×g,离心5min。弃上清,空气干燥15min,加入20μL 0.1%(体积分数)DEPC水,充分溶解,-20℃保存。用核酸蛋白定量仪定量[积分光密度(1OD)260=40μg RNA/mL],分析浓度、纯度。逆转录:5μg的总RNA,加入1μL(0.5g/L)的随即引物(Oligo dT),加入相应体积DEPC水,使其总体积为10μL,作为RNA模板。混旋离心,72℃变性5min,0℃5min。将变性的RNA模板加入以下体系,总反应体积为25μL。逆转录参数:42℃1h,95℃5min。

1.6.2 PCR 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所用引物由上海生工生物技术公司合成。管家基因  $\beta$ -actin 作为内参照。引物序列和扩增片段长度见表1。

表1 PCR 目的基因引物序列  
Table 1 Primer sequence for PCR

基因 Gene	引物 Primer(5'→3')	长度(bp) Length
NR2A	转录(Sense): TCC ATT CTT CTG TCA TCC TGC	224
	逆转录(Antisense): AAG ACC GTC TCT CAC TCT TGC	
NR2B	转录(Sense): TGC ACA ATT ACT CCT CGA CG	222
	逆转录(Antisense): TCC GAT TCIT CTT CTG AGC C	
NR2C	转录(Sense): TTT AGG ACA ACG TGG ACA CC	204
	逆转录(Antisense): TCC ACT CGT ATT CCT CCA GC	
$\beta$ -actin	转录(Sense): TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA T	432
	逆转录(Antisense): AAA GAA AGG GTG TAA AAC GCA	

扩增产物于1%(体积分数)琼脂糖凝胶中电泳(含0.5g/L的溴化乙锭),110V,50min。凝胶成像系统拍照并分析光密度,PCR产物量以面积表示。各剂量组目的基因与管家基因  $\beta$ -actin 的比值表示 mRNA 的相对表达水平。

### 1.7 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 对数据进行分析,汞含量测定结果和水迷宫潜伏时间采用单因素方差分析,NMDA mRNA 表达采用 Student's-t 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 出生后不同生长期甲基汞暴露大鼠脑组织汞含量

由表2可见,出生后不同时期,染毒组海马和皮质组织中汞含量均明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.2 出生后不同生长期大鼠甲基汞暴露成年后脑组织汞含量

由表3可见,PND7、PND14染毒组脑组织汞含量与对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );PND28染毒组皮质汞含量高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );PND60染毒组海马和皮质中汞含量均明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 2 不同发育期甲基汞暴露每克脑组织汞含量 (n=6)

Table 2 Mercury concentration in brain after MMC exposure

组别 (Group)	海马 (Hippocampus)	皮质 (Cerebral cortex)
PND7 染毒 (MMC-treated)	1.47 ± 0.29*	1.48 ± 0.06*
PND7 对照 (Control)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
PND14 染毒 (MMC-treated)	1.62 ± 0.90*	1.27 ± 0.11*
PND14 对照 (Control)	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01
PND28 染毒 (MMC-treated)	1.44 ± 0.23*	1.36 ± 0.28*
PND28 对照 (Control)	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00
PND60 染毒 (MMC-treated)	1.44 ± 0.41*	1.07 ± 0.16*
PND60 对照 (Control)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01

[注]\*: 与对照组比较 (Compared with the control group),  $P < 0.01$ 。

表 3 出生后不同生长期甲基汞暴露大鼠水迷宫测试后每 g 脑组织汞含量 (n=5)

Table 3 Mercury concentration in brain after Morris water maze test

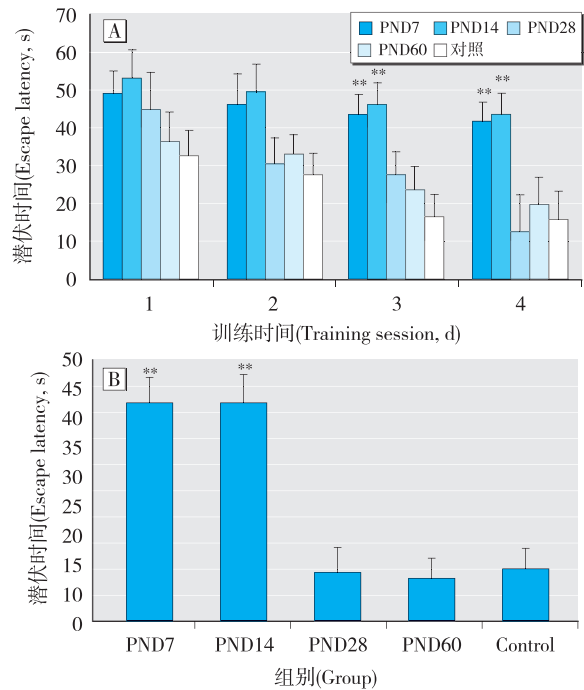
组别 (Group)	海马 (Hippocampus)	皮质 (Cerebral cortex)
染毒组 (MMC-treated)		
PND7	0.050 ± 0.001	0.050 ± 0.006
PND14	0.060 ± 0.003	0.030 ± 0.009
PND28	0.130 ± 0.002	0.180 ± 0.001**
PND60	1.780 ± 0.150*	1.170 ± 0.060*
对照组 (Control)	0.020 ± 0.002	0.040 ± 0.001

[注]\*: 与对照组比较 (Compared with the control group),  $P < 0.01$ , \*\*:  $P < 0.05$ 。

2.3 甲基汞暴露对出生后不同生长期大鼠的学习记忆影响

由图 1A 可见在第一次入水训练时, 各染毒组大鼠的潜伏期与对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 从第 3 天开始, PND7、PND14 染毒组大鼠潜伏期长于对照组, 差异具有统计学意义 ( $F = 3.025, P = 0.042$ ); PND28、PND60 染毒组大鼠潜伏期与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

由图 1B 可见正式测试时, PND7、PND14 染毒组大鼠潜伏期明显长于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); PND28、PND60 染毒组大鼠潜伏期与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



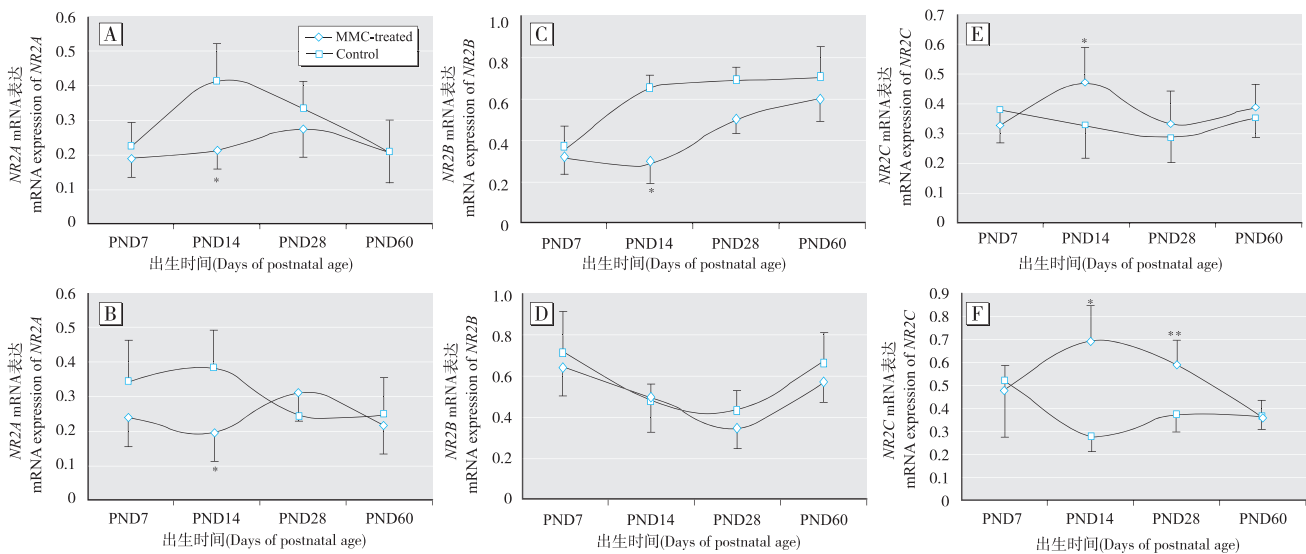
[注]\*\*: 与对照组比较 (Compared with the control group),  $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠水迷宫潜伏期 (n=5)

Figure 1 Escape latency after Morris water maze

2.4 甲基汞暴露对出生后不同生长期大鼠脑组织 NR2 亚基 mRNA 水平表达的影响

对 PCR 产物进行定量分析, 结果 (图 2) 表明, 与对照组相比, 染毒组海马和皮质组织中 NR2A、NR2B、NR2C mRNA 表达在 PND7 时, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 海马组织中的 NR2A、NR2B 以及皮质组织中的 NR2A 表达在 PND14 时明显低于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 海马组织中的 NR2C 表达在 PND14 以及皮质组织中的 NR2C 表达在 PND14、PND28 明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 其余染毒组与对照组相比, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



[注]\*: 与对照组相比 (Compared with the control group),  $P < 0.01$ ; \*\*:  $P < 0.05$ 。A、C、E: 海马 (Hippocampus); B、D、F: 皮质 (Cerebral cortex)。

图 2 甲基汞暴露对生后不同生长期大鼠海马及皮质 NMDA 2 亚基表达影响

Figure 2 NMDAR 2 subunit expression of different postnatal age following MMC exposure

### 3 讨论

日本水俣病以及伊拉克甲基汞中毒事件发生后,在回顾性研究中,人们发现甲基汞对成熟脑组织主要是局部的影响,接触甲基汞的孕母并没有明显的临床症状,但宫内接触甲基汞的胎儿出现死胎或畸胎现象,即使孩子正常出生后,在数月至 6、7 岁的时候也大多出现神经系统发育的缺陷<sup>[4]</sup>。

妊娠期甲基汞暴露一直受到较多关注,而事实上,哺乳期甲基汞暴露仍然会对发育中的 CNS 造成损伤。我们对出生后大鼠不同生长时期的甲基汞暴露 7 d 后检测其脑组织汞含量发现,各染毒组中无论是海马组织还是皮质组织中汞含量都明显高于对照组,说明脑组织对甲基汞比较敏感。MIYAMOTO 等<sup>[5]</sup>对不同时期大鼠甲基汞染毒发现,PND16 大鼠大脑皮质及海马组织损伤较其他时期严重。各染毒组剩余大鼠在 7d 染毒结束后正常饲养至 PND69 后再次检测脑组织汞含量,发现早期染毒大鼠脑组织的汞含量明显下降,而 PND28 皮质以及 PND60 染毒亚组脑组织中汞含量明显高于对照组。随着年龄增长,脑组织中的汞可不断代谢并排出体外。

为进一步研究出生后不同时期甲基汞对大鼠学习记忆功能的影响,我们对其进行水迷宫测试,结果显示,PND7、PND14 染毒大鼠的学习记忆能力明显低于对照组和 PND28、PND60 染毒组。相反,PND28 和 PND60 染毒组,虽然汞含量较高但其对大鼠学习记忆能力造成的损伤程度却较小,与对照组相比无明显差异。这一结果提示,随着年龄增长汞含量可不断下降,甲基汞暴露对出生早期仔鼠可造成学习记忆损伤,且该损伤并不随着时间增加和浓度的降低而得到恢复,可一直持续到成年。

学习记忆是一个非常复杂的过程,其细胞和分子机制仍不清楚。甲基汞引起的学习记忆能力损伤和许多神经递质系统有关,尤其是谷氨酸系统可以引起持续性的改变。NMDA 受体作为谷氨酸的兴奋性受体之一,属离子型谷氨酸受体。主要有 NR1 亚基和 NR2 或 NR3 亚基构成。NR2 亚基共有 4 种类型(A-D),分别行使不同功能。NMDA 受体通过不同亚基的选择性表达,改变自身结构和功能,影响神经元的迁移和突触可塑性,调控中枢神经系统的发育。在发育过程中,NMDA 受体的亚基构成发生变化,有报道显示,发育早期 NR2B 居多,分布在全脑各处, NR2A 则仅局限于海马等区域,随着发育过程, NR2A 的含量逐渐增加且分布范围扩大, NR2B 则仅在杏仁体、海马等可塑性的脑区终生表达<sup>[6]</sup>。本研究发现,甲基汞暴露可能影响了 NMDA 2 亚基的表达,各染毒组 NR2A 亚基的表达在海马和皮质都有不同程度下降,PND14 尤为显著。有研究表明海马 CA1 区,阻断 NR2A 后,LTP 不能被诱导<sup>[7]</sup>, NR2A 敲除的小鼠显示 LTP 阈值增加,水迷宫潜伏期较长<sup>[8]</sup>。NR2B 的表达也有所下降,尤其是海马区,这可能与 NR2B 在长时程增强(long term potentiation, LTP)诱导中起抑制性作用有关,阻断 NR2B,长时程抑制(long term depression, LTD)不能被诱导<sup>[7]</sup>。TANG 等<sup>[9]</sup>发现, NR2B 表达较高的小鼠在学习记忆方面能力增强。与 NR2A、NR2B 不同, NR2C 表达增加。发育期,尤其是出生后 7~14d, CNS 神经元对 NMDA 也很敏感,这可能是由于 NMDA 2C 亚单位表达的增加<sup>[10]</sup>。由于 NR2C 对 Mg<sup>2+</sup> 的抑制作

用不敏感,同时 NR2A/NR2C 的 C 末端可以调节突触 NMDA 受体的活化,可以增强通道的开放率,诱导 LTP,也有学者认为包含 NR2C 的 NMDA 受体主要诱导 LTD 的产生<sup>[11]</sup>。

MIYAMOTO 等<sup>[5]</sup>认为通过激活 NMDA 受体产生过氧亚硝酸盐是甲基汞对发育中的皮质神经元产生神经毒性的重要机制。在子鼠出生后第 16 天, NMDA 受体敏感性增高,使该日龄鼠对甲基汞的神经毒性最敏感。本实验结果显示 NMDA 的 NR2A、NR2B、NR2C mRNA 表达在 PND14 亚组的改变最显著,表明甲基汞对学习记忆的损伤一定程度上与这三种亚基的表达改变有关。

(志谢:感谢国家环境保护总局资助项目对本研究的支持!)

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

### 参考文献:

- [1] KAKITA A, WAKABAYASHI K, SU M, et al. Intrauterine methylmercury intoxication. Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity[J]. Brain Res, 2000, 877(2): 322-330.
- [2] SHIGEMATSU J, YASUDA T, GOTO Y, et al. Recovery of brain dysfunction after methylmercury exposure in rats[J]. J Neurol Sci, 2000, 182(1): 61-68.
- [3] RIEDEL G, PLATT B, MICHEAU J. Glutamate receptor function in learning and memory[J]. Behav Brain Res, 2003, 140(1/2): 1-47.
- [4] CORDIER S, GAREL M, MANDEREAU L, et al. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana[J]. Environ Res, 2002, 89(1): 1-11.
- [5] MIYAMOTO K, NAKANISHI H, MORIGUCHI S, et al. Involvement of enhanced sensitivity of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity[J]. Brain Res, 2001, 901(1/2): 252-258.
- [6] CHARTON JP, HERKERT M, BECKER CM, et al. Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon[J]. Brain Res, 1999, 816(2): 609-617.
- [7] KIYAMA Y, MANABE T, SAKIMURA K, et al. Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit[J]. J Neurosci, 1998, 18(17): 6704-6712.
- [8] LIU L, WONG TP, POZZA MF, et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity[J]. Science, 2004, 304(5673): 1021-1024.
- [9] TANG YP, SHIMIZU E, DUBE GR, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. Nature, 1999, 401(6748): 63-69.
- [10] MOHN AR, GAINETDINOV RR, CARON MG, et al. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia[J]. Cell, 1999, 98(4): 427-436.
- [11] HENDRICKSON AW, MIAO CL, LIPPMANN MJ, et al. Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 301(3): 938-944.

(收稿日期: 2011-04-11)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 王晓宇; 校对: 张晶)