

肠道菌群失调对甲基汞染毒小鼠组织汞及粪汞含量的影响

黄红茜^a, 李凤敏^a, 张爱华^{a, b}, 韩雪^a

贵州医科大学 a. 公共卫生学院 b. 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20532

摘要:

[背景] 肠道微生物可通过直接或间接作用影响重金属的代谢吸收, 但其在甲基汞代谢吸收中的作用及机制尚不明确。

[目的] 探究肠道菌群对甲基汞吸收、分布和排泄的影响及可能的机制。

[方法] 20只雌性BALB/c小鼠随机分为空白组、菌群失调组、甲基汞组、菌群失调+甲基汞组($n=5$)。对小鼠灌胃抗生素混合液(万古霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、硫酸新霉素 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、甲硝唑 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、氨苄青霉素 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以体重计, 后同, $1\text{次}\cdot\text{d}^{-1}$, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 4 d构建肠道菌群紊乱模型。通过PCR验证细菌16S rRNA的V4区, 判断菌群失调模型是否建立成功。对小鼠进行甲基汞染毒3 d ($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{次}\cdot\text{d}^{-1}$, 灌胃量 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 收集第一次甲基汞染毒后24、48、72 h的小鼠粪便, 实验结束处死小鼠, 收集血、肝脏、肾脏、脑、结肠及盲肠内容物样本。原子荧光光谱分析法测定肝、肾、脑、血、粪便中的总汞含量; pH计测定结肠及盲肠内容物pH值; HE染色法观察肠道组织病理改变; 反转录PCR法检测肠道紧密连接蛋白Occludin、Zo-1、Claudin-1 mRNA表达水平。

[结果] 紫外光下细菌16S rRNA通用引物PCR扩增产物电泳结果显示, 空白组小鼠具有良好的16S rRNA基因信号, 抗生素处理的小鼠未检测到明显信号, 表明抗生素处理清除了小鼠肠道内的细菌, 即肠道菌群失调建模成功。第一次甲基汞暴露后24 h、48 h和72 h, 菌群失调+甲基汞组粪汞含量 $[(90.39\pm 27.56)$ 、 (366.75 ± 81.82) 、 $(641.33\pm 354.24)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}]$ 低于甲基汞组 $[(259.87\pm 90.94)$ 、 (616.83 ± 197.90) 、 $(1322.50\pm 377.77)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}]$ ($P<0.05$)。菌群失调+甲基汞组肝、肾、脑、血总汞含量 $[(4090.38\pm 929.44)$ 、 (8539.97 ± 1242.64) 、 (1348.24 ± 336.69) 、 $(40290.00\pm 5515.11)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}]$ 高于甲基汞组 $[(2752.86\pm 566.09)$ 、 (4502.08 ± 105.76) 、 (827.54 ± 106.50) 、 $(28392.00\pm 813.25)\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}]$ ($P<0.05$)。与未给抗生素小鼠比较, 抗生素处理小鼠盲肠及结肠内容物pH值升高($P<0.05$)。HE染色显示菌群失调组具有肠绒毛坏死溶解, 上皮细胞脱落, 固有层轻微水肿等改变。与未给抗生素小鼠比较, 抗生素处理小鼠肠道紧密连接蛋白Occludin、Zo-1、Claudin-1 mRNA表达水平下降($P<0.05$)。

[结论] 肠道菌群可能是甲基汞代谢和汞循环的重要参与者。

关键词: 甲基汞; 肠道菌群; 抗生素; 肠屏障; 菌群失调

Effects of intestinal flora dysregulation on mercury concentrations in tissues and feces in methylmercury treated mice HUANG Hongqian^a, LI Fengmin^a, ZHANG Aihua^{a, b}, HAN Xue^a (a.School of Public Health b.Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] Intestinal microorganisms can directly or indirectly affect the metabolism and absorption of heavy metals, but their roles and mechanisms in the metabolism and absorption of methylmercury are still unclear.

[Objective] This experiment investigates the influences of intestinal flora on the absorption, distribution, and excretion of methylmercury and the possible mechanism.

[Methods] Twenty female BALB/c mice were randomly divided into four groups ($n=5$) as follows: blank group, dysbacterial group, methylmercury group, and dysbacterial+methylmercury group. Mice were given antibiotic mixture for 4 d (vancomycin $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, neomycin sulfate $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, metronidazole $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and ampicillin $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, in body weight, thereafter, once a

基金项目

贵州省区域内一流学科建设项目-公共卫生与预防医学(黔教科研发2017[85]号); 国家自然科学基金项目(U1812403)

作者简介

黄红茜(1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 1525958123@qq.com

通信作者

韩雪, E-mail: hanxueshiqi@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2020-11-15

录用日期

2021-04-10

文章编号

2095-9982(2021)05-0524-06

中图分类号

R114

文献标志码

A

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HAN Xue, E-mail: hanxueshiqi@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2020-11-15

Accepted

2021-04-10

To cite

HUANG Hongqian, LI Fengmin, ZHANG Aihua, et al. Effects of intestinal flora dysregulation on mercury concentrations in tissues and feces in methylmercury treated mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(5): 524-529.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20532

day, 10 mL·kg⁻¹) to establish an intestinal flora disorder model. The V4 region of 16S rRNA was detected by PCR to determine whether the bacterial flora disorder model was established successfully. The methylmercury group and the dysbacterial+methylmercury group were exposed to methylmercury for 3 d (0.5 mg·kg⁻¹, once a day, 10 mL·kg⁻¹ by gavage). The feces of each group were collected 24, 48, and 72 h after the first methylmercury exposure. At the end of the experiment, the mice were sacrificed, and samples of blood, liver, kidney, brain, colon, and cecum contents were collected. The total mercury levels in the liver, kidney, brain, blood, and feces were determined by atomic fluorescence spectrometry; the pH values of colon and cecum contents were tested with a pH meter; the intestinal pathological changes were observed after HE staining; the *Occludin*, *Zo-1*, and *Claudin-1* (tight junction proteins) mRNA expression levels were measured by reverse transcription PCR.

[Results] The results of electrophoresis of the PCR amplified products of bacterial 16S rRNA universal primers under ultraviolet light showed that the mice in the blank group had good 16S rRNA gene signals, while no obvious signal was detected in the antibiotic-treated mice, indicating that the antibiotic treatment eliminated the bacteria in the mouse intestine, and the model of intestinal flora disorder was successful. After 24, 48, and 72 h of the first methylmercury exposure, the fecal mercury levels of the dysbacterial+methylmercury group [(90.39±27.56), (366.75±81.82), and (641.33±354.24) ng·g⁻¹] were lower than the levels of the methylmercury group [(259.87±90.94), (616.83±197.90), and (1322.50±377.77) ng·g⁻¹] ($P<0.05$). The total mercury levels in the liver, kidney, brain, and blood of the dysbacterial+methylmercury group [(4090.38±929.44), (8539.97±1242.64), (1348.24±336.69), and (40290.00±5515.11) ng·g⁻¹] were higher than the levels of the methylmercury group [(2752.86±566.09), (4502.08±105.76), (827.54±106.50), and (28392.00±5813.25) ng·g⁻¹] ($P<0.05$). Compared with the mice without antibiotics treatment, the pH values of the cecum and colon contents of the antibiotic-treated mice increased ($P<0.05$). HE staining results showed that the dysbacterial mice had changes such as necrosis of intestinal villi, shedding of epithelial cells, and mild edema of the lamina propria. The *Occludin*, *Zo-1*, and *Claudin-1* mRNA expression levels of the antibiotic-treated mice were decreased compared with the mice without antibiotics treatment ($P<0.05$).

[Conclusion] Intestinal flora may be an important participant in methylmercury metabolism and mercury cycle.

Keywords: methylmercury; intestinal flora; antibiotics; intestinal barrier; flora disorder

甲基汞是汞的甲基化产物, 是一种具有神经毒性的环境污染物。环境中任何形式的汞(金属汞、无机汞等)均可在一定条件下转化为甲基汞, 并在动植物体内蓄积^[1], 摄入含甲基汞的食物是普通人群甲基汞暴露的主要途径^[2-3]。甲基汞主要经由肠道吸收, 约超过90%的甲基汞经肠道吸收后分布于全身各处^[4]。

人体肠道中存在600多种、约10¹³~10¹⁴个微生物, 从辅助消化食物、提供特定营养物质, 到占据消化道表层、抵御病原体入侵, 再到参与对免疫系统的训练等, 肠道菌群在调节和维持正常的身体机能方面有着不可或缺的作用^[5-6]。已有研究证实, 肠道菌群是调节外源化学物(如药物、重金属等)生物利用度和毒性的重要因子^[7-8]。

甲基汞主要经口暴露, 在人体内需经过广泛的肝肠循环过程, 其半衰期约为70d, 因此甲基汞与肠道菌群之间有着“亲密而持久”的接触, 但肠道微生物在甲基汞转运转化中的具体作用及机制尚未明晰。本研究通过构建抗生素诱导的肠道菌群紊乱动物模型, 探讨肠道微生物在甲基汞吸收、分布、排泄中的作用, 为甲基汞中毒的防治研究提供思路和资料。

1 对象与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: 万古霉素、硫酸新霉素、甲硝唑、氨苄青霉素(上海源叶, 中国), 粪便DNA提取试剂

盒(QIAGEN, 德国), TRIzol试剂(Invitrogen, 美国), 甲基氯化汞(Sigma, 美国), 荧光标记的右旋糖酐(Sigma, 美国)。

主要仪器: 3020-426多功能全波长酶标仪(Thermo, 美国), 实时荧光定量PCR仪(Eppendorf, 美国), PHSJ-4F精密pH计(上海精科仪器厂, 中国), AFS-8520原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司, 中国), 高压密闭消解罐(东台市中凯亚科技有限公司, 中国)。

1.2 实验动物和暴露方法

1.2.1 实验动物及分组 20只7周龄SPF级健康雌性BALB/c小鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司[合格证号: SCXK(辽)2015-0001], 饲养于贵州医科大学医学实验动物中心, 12h亮/暗循环, 自由摄水摄食, 适应性饲养一周后将小鼠随机分为4组(每组5只): 空白组、菌群失调组(单独抗生素干预组)、甲基汞组、菌群失调+甲基汞组。本动物实验遵循贵州医科大学实验动物伦理委员会规定(编号: No.1900249)。

1.2.2 肠道菌群紊乱模型构建及甲基汞染毒方案 参照文献[9-10], 使用四联抗生素构建肠道菌群紊乱模型, 四联抗生素混合液含万古霉素100 mg·kg⁻¹(以体重计, 后同)、硫酸新霉素200 mg·kg⁻¹、甲硝唑200 mg·kg⁻¹、氨苄青霉素200 mg·kg⁻¹。BALB/c小鼠经四联抗生素混合液处理4d, 1次·d⁻¹, 灌胃量10 mL·kg⁻¹。抗生素给药完毕后无菌收集小鼠粪便, 提取粪便微生物DNA, 通

过PCR验证细菌16S rRNA的V4区基因水平^[11], 设空白管为阴性对照。根据细菌16S rRNA的V4区基因水平判断建模是否成功, 抗生素干扰后小鼠粪便DNA无法扩增出信号, 则可表明大多数肠道细菌已被清除, 菌群紊乱模型建立成功, 造模成功后给予甲基汞染毒3 d ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, 灌胃量 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

1.3 主要实验指标

1.3.1 体重与脏器系数 称量并记录小鼠染毒前及终末期体重。终末取血结束后, 颈椎脱臼处死小鼠并立即进行解剖, 称量小鼠肝脏、肾脏、脑及整段盲肠, 计算脏器系数。脏器系数 = 脏器湿重 (mg) / 总体重 (g)。

1.3.2 汞含量检测 甲基汞组和菌群失调+甲基汞组进行甲基汞染毒3 d, 每天固定时间点灌胃。第一次甲基汞染毒后24、48、72 h收集各组粪便, 检测粪便总汞含量; 染毒结束采用5%水合氯醛麻醉小鼠, 眼球取血, 处死小鼠后收集肝脏、肾脏、脑、盲肠及结肠内容物样本, 液氮瓶中速冻, -80°C 冰箱冷冻保存。参考GB 5009.17—2014《食品安全国家标准 食品中总汞及有机汞的测定》中总汞的测定方法, 采用压力罐消解对样本进行预处理, 原子荧光光谱分析法检测粪便、血液、肝脏、肾脏及脑组织中总汞含量。方法检出限为 $0.003 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 加标回收率为83%~117%。

1.3.3 盲肠、结肠内容物pH的检测 实验结束, 处死小鼠后收集小鼠盲肠及结肠内容物, 称取盲肠内容物60 mg, 按1 mg盲肠内容物添加7 μL 预冷的去离子水配置混合液, 利用组织研磨仪匀浆 (45 Hz, 150 s), 在 4°C 、 $3500 \times g$ 的条件下离心10 min, 取上清于新的EP管中, 重复提取一次, 将两次提取液合并后用pH计检测pH值。

1.3.4 肠组织病理形态学观察 体积分数4%的多聚甲醛固定回肠组织, 常规脱水, 石蜡包埋, 组织切片, 进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE染色), 光学显微镜下观察肠组织病理学变化。

1.3.5 肠道紧密连接蛋白mRNA水平检测 提取肠组织RNA鉴定其纯度及完整性, 反转录合成cDNA, 反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测肠道紧密连接蛋白Zo-1、Claudin-1、Occludin基因mRNA的水平。引物序列见表1。

1.4 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行数据统计分析。各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用LSD或Games-Howell检验法。总汞含量比

较用独立样本t检验进行统计分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

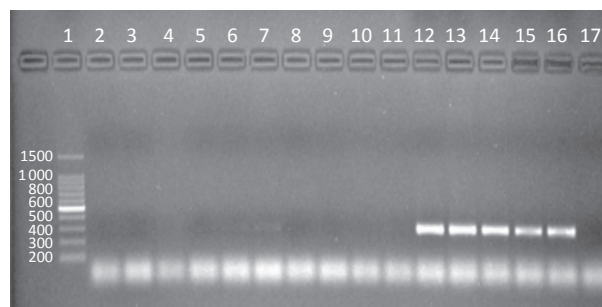
表1 肠道紧密连接蛋白基因RT-PCR反应引物
Table 1 Primers for RT-PCR of intestinal tight junction protein genes

基因名称	引物序列 (5'-3')
Zo-1	正向引物: GACCAGTACCCGCGAAG
	反向引物: CAGAGGAGGGACAACCTGC
Claudin-1	正向引物: ATCCCAAGCCAACACCT
	反向引物: ACCACAGTTCGATAACCA
Occludin	正向引物: CAATGGCCTACTCCTCCA
	反向引物: TGCCTGAAGTCATCCACA
β -actin	正向引物: CCTCACTGTCCACCTTCC
	反向引物: GGGTGTAACACGCAGCTC

2 结果

2.1 肠道菌群失调模型造模结果

空白组和甲基汞组都未给予抗生素处理, 默认空白组和甲基汞组肠道菌群的状态一致, 因此, 选择空白组为对照。如图1, 空白组小鼠粪便微生物DNA含量为 $(51.07 \pm 31.65) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 抗生素处理小鼠粪便未检测到明显DNA含量。紫外光下细菌16S rRNA通用引物PCR扩增产物电泳结果显示, 空白组小鼠具有良好的16S rRNA基因信号, 抗生素处理的小鼠未检测到明显信号, 表明抗生素处理清除了小鼠肠道内的细菌, 即肠道菌群失调建模成功。



[注] 1为DNA Marker; 2~6为菌群失调组; 7~11为菌群失调+甲基汞组; 12~16为空白组; 17为阴性对照。

图1 小鼠16S rRNA V4通用引物PCR产物凝胶电泳图
Figure1 The gel electrophoresis diagram of the PCR product of 16S rRNA V4 of mice using universal primers

2.2 脏器系数

各组小鼠肝脏、盲肠脏器系数的差异具有统计学意义 ($F_{\text{肝}}=9.901$, $P=0.001$; $F_{\text{盲肠}}=14.529$, $P<0.001$), 脑及肾脏脏器系数差异无统计学意义。与空白组相比, 菌群失调组肝脏脏器系数下降 ($P<0.05$), 盲肠脏器系数升高 ($P<0.05$); 与甲基汞组相比, 菌群失调+甲基汞组肝脏脏器系数下降 ($P<0.05$), 盲肠脏器系数升高 ($P<0.05$)。见表2。

表2 小鼠脑、肝、肾、盲肠的脏器系数 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 2 Organ coefficients of brain, liver, kidney, and cecum of mice ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分组	脑脏器系数	肝脏脏器系数	肾脏脏器系数	盲肠脏器系数
空白组	21.64±0.83	44.15±2.85	11.28±0.98	16.03±5.57
甲基汞组	22.35±0.26	45.62±3.09	11.28±0.80	15.04±4.45
菌群失调组	22.90±0.25	39.29±0.95 ^a	11.12±0.86	33.31±8.21 ^a
菌群失调+甲基汞组	23.25±2.77	39.09±2.03 ^b	11.67±0.54	32.78±4.76 ^b

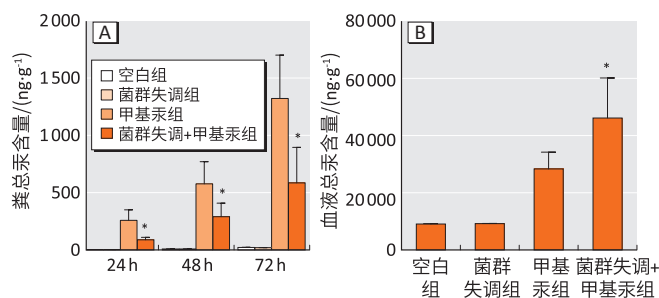
[注] a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与甲基汞组比较, $P<0.05$ 。

2.3 血及粪便总汞含量

随着甲基汞的暴露时间延长, 小鼠粪汞的排泄量增加。第一次甲基汞暴露后 24、48、72 h, 甲基汞组的粪汞含量分别为 (259.87 ± 90.94)、(616.83 ± 197.90)、(1322.50 ± 377.77) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 菌群失调+甲基汞组分别为 (90.39 ± 27.56)、(366.75 ± 81.82)、(641.33 ± 354.24) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与甲基汞组相比, 菌群失调+甲基汞组小鼠粪便总汞含量降低 ($t_{24\text{h}}=3.650$, $P=0.011$; $t_{48\text{h}}=2.828$, $P=0.022$; $t_{72\text{h}}=3.015$, $P=0.024$)。菌群失调+甲基汞组与甲基汞组血汞含量分别为 ($40\,290.00\pm5\,515.11$)、($28\,392.00\pm5\,813.25$) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 血汞含量升高 ($t=-2.623$, $P=0.031$)。空白组及菌群失调组总汞含量差异无统计学意义, 详见图 2。

2.4 肝、肾、脑总汞含量

甲基汞组肝、肾、脑总汞含量分别为 (2752.86 ± 566.09)、($4\,502.08\pm105.76$)、(827.54 ± 106.50) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 菌群失调+甲基汞组分别为 (4090.38 ± 929.44)、($8539.97\pm1\,242.64$)、($1\,348.24\pm336.69$) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与甲基汞组相比, 菌群失调+甲基汞组小鼠肝、肾、脑总汞含量均升高 ($t_{\text{肝}}=-2.748$, $P=0.025$; $t_{\text{肾}}=-6.476$, $P=0.001$; $t_{\text{脑}}=-3.297$, $P=0.011$)。空白组及菌群失调组总汞含量差异无统计学意义。



[注] *: 与甲基汞组比较, $P<0.05$ 。

图2 甲基汞暴露期间小鼠粪便总汞 (A) 和血液总汞 (B) 含量 ($n=5$)

Figure 2 Total mercury level in feces (A) and blood (B) of mice during methylmercury exposure ($n=5$)

2.5 盲肠及结肠内容物 pH

各组小鼠盲肠及结肠内容物 pH 值差异有统计学意义 ($F_{\text{盲肠}}=11.295$, $P<0.001$, $F_{\text{结肠}}=54.081$, $P<0.001$)。与空白组相比, 菌群失调组盲肠及结肠内容物 pH 值升高 (均 $P<0.05$)。与甲基汞组相比, 菌群失调+甲基汞组盲肠及结肠内容物 pH 值升高 (均 $P<0.05$)。见表 3。

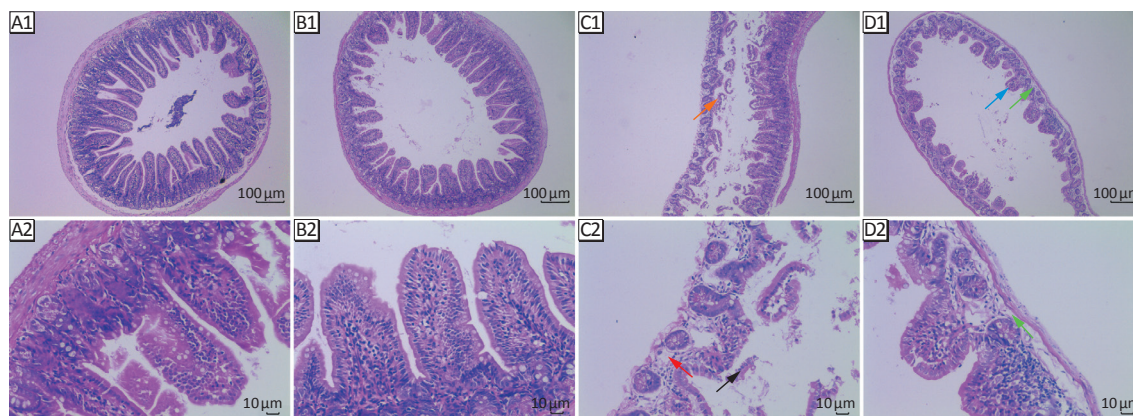
表3 小鼠盲肠及结肠内容物 pH 值 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 3 pH values of cecum and colon of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分组	盲肠	结肠
空白组	7.98±0.06	7.49±0.10
甲基汞组	7.94±0.14	7.47±0.06
菌群失调组	8.24±0.04 ^a	7.95±0.07 ^a
菌群失调+甲基汞组	8.08±0.11 ^b	8.11±0.13 ^b

[注] a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与甲基汞组比较, $P<0.05$ 。

2.6 肠组织病理形态学观察

如图 3 所示, 空白组回肠组织结构完整, 肠绒毛较长且较为整齐, 肠绒毛被覆单层柱状上皮, 黏膜下层、肌层和外膜连接紧密, 未见明显病理变化; 菌群失调组肠绒毛坏死溶解, 上皮细胞脱落, 固有层轻微水肿等改变。



[注] 1: $\times 100$, 2: $\times 400$ 。A: 空白组; B: 甲基汞组; C: 菌群失调组; D: 菌群失调+甲基汞组。橙色箭头指肠绒毛坏死溶解, 蓝色箭头指肠绒毛变短, 绿色箭头指肠壁变薄, 红色箭头指上皮细胞脱落, 黑色箭头指固有层轻微水肿。

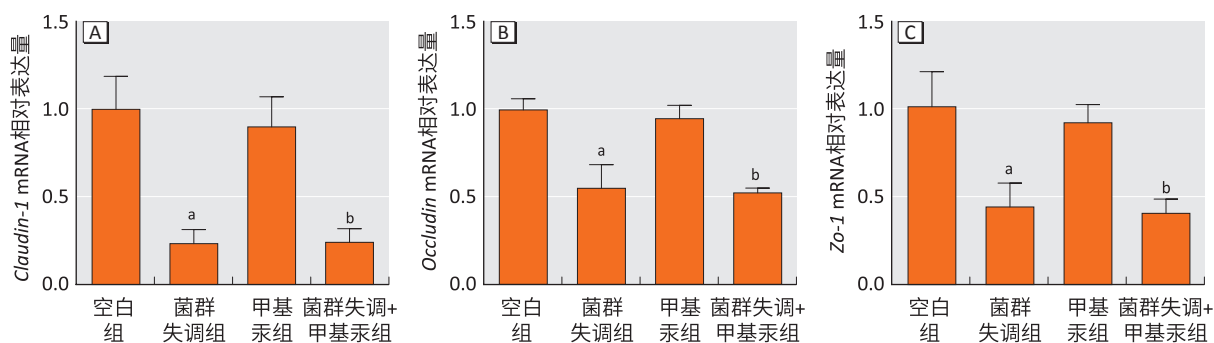
图3 各组小鼠肠组织病理学变化 (HE 染色)

Figure 3 Pathological changes of intestine of mice in each group (HE staining)

2.7 肠道紧密连接蛋白 mRNA 的表达

各组小鼠肠组织肠道紧密连接蛋白 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($F_{Occludin}=8.855$, $P=0.006$; $F_{Zo-1}=7.748$, $P=0.009$; $F_{Claudin-1}=13.753$, $P=0.002$)。与空白组相比,

菌群失调组肠组织 *Occludin*、*Zo-1*、*Claudin-1* mRNA 表达水平下降 (均 $P<0.05$) ; 与甲基汞组相比, 菌群失调+甲基汞组肠组织 *Occludin*、*Zo-1*、*Claudin-1* mRNA 表达水平下降 (均 $P<0.05$)。见图4。



[注] a : 与空白组比较, $P<0.05$; b : 与甲基汞组比较, $P<0.05$ 。

图4 小鼠 *Claudin-1* (A)、*Occludin* (B) 和 *Zo-1* (C) mRNA 表达水平

Figure 4 The expression levels of *Claudin-1* (A), *Occludin* (B), and *Zo-1* (C) mRNA of mice

3 讨论

作为接触外源化学物的第一批“细胞”, 肠道某些益生菌可与外源化学物螯合使其随着菌株通过粪便排泄, 或将外源化学物进行代谢转化, 改变其溶解性进而将其清除。甲基汞向无机汞的生物转化被认为是甲基汞消除的必要中间步骤, 来自甲基汞的“汞”转化为不易吸收的无机汞后主要经粪便排泄。Caito 等^[12]观察到人类在服用抗生素后, 体内甲基汞的消除速度明显降低。Bisanz 等^[13]则发现与对照组相比, 每天食用益生菌 (即酸奶) 的坦桑尼亚孕妇血汞浓度显著降低。Jadán-Piedra 等^[10]的研究也发现益生菌即嗜酸乳杆菌 BL17 和干酪乳杆菌 BL23 可促进甲基汞暴露小鼠粪汞的排出, 减少体内汞水平。与以往研究相似, 在本研究中, 相对于正常小鼠, 菌群紊乱小鼠体内血、肝、肾、脑组织的汞含量升高, 而排出的粪汞含量降低, 提示肠道菌群可能是甲基汞代谢和汞循环的重要参与者。

肠黏膜屏障由肠道上皮细胞连接复合体及其分泌物、肠相关免疫细胞及肠内正常菌群组成, 主要包括生物屏障、化学屏障、机械屏障和免疫屏障。肠黏膜屏障作为控制有毒化学物进入机体的第一道防线, 能限制肠腔内有害物质如毒素或细菌穿过肠黏膜进入血液循环和体内其他组织器官, 其完整性依赖于微生物与宿主的相互作用。肠道微生物可通过影响肠道上皮通透性和紧密连接, 调控肠道上皮细胞凋亡等多种作用影响肠道机械屏障。体外研究结果显示, 肠道菌群可

通过改善肠道机械屏障功能阻止肠上皮细胞对粪便中浓缩甲基汞的再吸收^[14]。紧密连接蛋白 *Zo-1*、*Occludin* 表达量及分布的变化可以代表肠屏障功能的变化^[15]。本研究发现相对于空白组, 菌群紊乱小鼠的肠道出现了肠绒毛坏死溶解、上皮细胞脱落等病理改变; 同时, 菌群紊乱小鼠的紧密连接蛋白 *Claudin-1*、*Occludin*、*Zo-1* mRNA 表达水平下降, 提示肠黏膜机械屏障可能受损, 通过增加肠道通透性可使甲基汞更易通过肠屏障或直接从肠细胞间渗漏, 增加甲基汞的吸收。

肠道微生物除构成肠道的生物屏障外, 还可通过促进黏液的分泌和产生特殊代谢产物影响肠内环境的稳态, 调节肠道化学屏障^[16]。肠道菌群产生的水解酶催化底物生成的有机酸及短链脂肪酸可降低肠腔 pH 值, 而肠道 pH 值则可影响金属离子的溶解性和细胞表面基团的电离状态, 进而干扰其转运。本研究发现菌群紊乱小鼠盲肠及结肠内容物 pH 值高于空白组, 提示肠道菌群通过参与维持肠道内环境的稳态影响甲基汞的吸收。

盲肠是汞吸收的主要部位之一, 本研究发现菌群紊乱小鼠盲肠的重量大约是空白组的两倍。已有研究发现, 无菌鼠的盲肠比普通鼠大 5~7 倍^[17], 因此推测盲肠的重量及体积受到肠道微生物的影响。盲肠内容物的增多、变稀可使小鼠肠动力下降^[18], 使肠内容物在盲肠内的停留时间延长, 从而增加小鼠体内甲基汞的吸收, 这也是本研究观察到血汞及组织汞浓度增加的可能原因之一。

本研究结果表明, 肠道菌群直接参与或间接影响着甲基汞的吸收、分布与排泄, 肠道菌群紊乱可促进甲基汞的吸收, 减少其排泄, 增加其在组织中的分布。肠道菌群是一个复杂而庞大的系统, 不同的菌群在物质转运转化中扮演着不同的角色, 因此, 肠道菌群在甲基汞体内动力学过程中的具体作用机制还需要进一步的研究与探索。

参考文献

- [1] LIEM-NGUYEN V, SKYLLBERG U, BJÖRN E. Methylmercury formation in boreal wetlands in relation to chemical speciation of mercury (II) and concentration of low molecular mass thiols [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 755 : 142666.
- [2] BUDNIK LT, CASTELEYN L. Mercury pollution in modern times and its socio-medical consequences [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 654 : 720-734.
- [3] QIU G, FENG X, LI P, et al. Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56 (7) : 2465-2468.
- [4] MERGLER D, ANDERSON HA, CHAN LH, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans : a worldwide concern [J]. *Ambio*, 2007, 36 (1) : 3-11.
- [5] VALDES AM, WALTER J, SEGAL E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. *BMJ*, 2018, 361 : k2179.
- [6] ASSEFA S, KÖHLER G. Intestinal microbiome and metal toxicity [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2020, 19 : 21-27.
- [7] ZHANG F, HE F, LI L, et al. Bioavailability based on the gut microbiota : a new perspective [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84 (2) : e00072-19.
- [8] ZHAI Q, TIAN F, ZHAO J, et al. Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82 (14) : 4429-4440.
- [9] GONG S, LAN T, ZENG L, et al. Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2018, 69 (1) : 51-59.
- [10] JADÁN-PIEDRA C, CRESPO Á, MONEDERO V, et al. Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 128 : 147-153.
- [11] CHI L, LAI Y, TU P, et al. Lipid and cholesterol homeostasis after arsenic exposure and antibiotic treatment in mice : potential role of the microbiota [J]. *Environ Health Perspect*, 2019, 127 (9) : 097002.
- [12] CAITO SW, JACKSON BP, PUNSHON T, et al. Editor's highlight : variation in methylmercury metabolism and elimination status in humans following fish consumption [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 161 (2) : 443-453.
- [13] BISANZ JE, ENOS MK, MWANGA JR, et al. Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children [J]. *mBio*, 2014, 5 (5) : e01580-14.
- [14] VÁZQUEZ M, CALATAYUD M, VÉLEZ D, et al. Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells [J]. *Toxicology*, 2013, 311 (3) : 147-153.
- [15] 闫丽娜. 大黄素对肠上皮细胞紧密连接蛋白损伤的保护作用研究 [D]. 天津 : 天津医科大学, 2015.
- YAN LN. Study of protective effect of emodin on damage of tight-junction protein of intestinal epithelial cells [D]. Tianjin : Tianjin Medical University, 2015.
- [16] 邢肖伟, 陶金华, 江曙, 等. 肠道菌群影响黏膜屏障结构与功能的研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30 (6) : 725-730.
- XING XW, TAO JH, JIANG S, et al. The impacts of intestinal microflora on the structure and functions of intestinal mucosal barrier : research progress [J]. *Chin J Microecol*, 2018, 30 (6) : 725-730.
- [17] WOSTMANN B, BRUCKNERKARDOSS E. Development of cecal distention in germ-free baby rats [J]. *Am J Physiol*, 1959, 197 (6) : 1345-1346.
- [18] 谢韬, 加潇坤, 陈木彬. 抗生素诱导的小鼠肠动力减弱与肠胶质细胞过度活化相关 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35 (3) : 199-205.
- XIE T, JIA XK, CHEN MB. Gut mobility attenuation induced by antibiotics is associated with overactivation of enteric glial cells in mice [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2019, 35 (3) : 199-205.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 陈姣)