

贵州汞污染地区大米神经毒性基因水平研究

程金平¹, 王文华^{1*}, 瞿丽雅², 贾金平¹, 郑敏³, 林学钰⁴ (1.上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2.贵州省环境科学研究设计院, 贵州 贵阳 550002; 3.上海交大学生命科学技术学院, 上海 200240; 4.吉林大学环境与资源学院, 吉林 长春 130026)

摘要: 为从分子基因水平探讨汞污染地区大米的神经毒性, 用贵州 2 个汞污染区(万山汞矿和清镇化工厂)产的大米喂养大鼠, 分别于 20d 和 30d 后, 用 RT-PCR 方法检测脑中即刻早期基因 c-fos mRNA 表达变化, 并以非污染区作对照。结果表明, 汞污染大米能够极显著诱导大鼠脑 c-fos mRNA 表达, 并且该表达是持续的。应用 c-fos mRNA 表达变化早期预报汞神经毒性是有可能的。

关键词: 汞污染大米; 神经毒性; 基因表达; RT-PCR; c-fos mRNA

中图分类号: Q523.R153.13.X18 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2004)06-0743-03

Study the neurotoxicity in gene level of rice from mercury contaminated areas in Guizhou. CHENG Jin-ping¹, WANG Wen-hua¹, QU Li-ya², JIA Jin-ping¹, ZHENG Min³, LIN Xue-yu⁴ (1.School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2.Guizhou Institute for Environmental Protection, Guiyang 550002, China; 3.School of Life Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 4.College of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China). *China Environmental Science*, 2004,24(6): 743~745

Abstract: In order to probe into the neurotoxicity in gene level of rice from typical mercury contaminated areas in Guizhou, the expression change of c-fos mRNA in rat brain using rice produced in Wanshan and Qingzhen of Guizhou to feed rat after 20days and 30days was observed with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods, and compared with the non-polluted control area. The mercury polluted rice induced significantly the expression of c-fos mRNA in rat brain, and the expression was continued. It could be inferred that applying the expression change of c-fos mRNA it could be possible to forecast the early neurotoxicity.

Key words: mercury contaminated rice; neurotoxicity; gene expression; RT-PCR; c-fos mRNA

贵州是我国主要的汞产地,产量约占全国的 70%^[1,2]。巨大的汞产量带来高经济效益的同时,也给当地造成了严重的汞污染。万山汞矿和清镇化工厂是贵州汞污染两个典型区域,经贵州环境科学研究设计院大量的调查研究工作证实,两地区环境均受到了不同程度的汞污染。本课题组通过实地调查发现,该地区水、土、气环境介质样品中以及农作物、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^[3]。

本研究用万山和清镇两地区实验田生产的大米对大鼠进行 20d 和 30d 暴露,通过 RT-PCR 方法检测脑中 c-fos mRNA 表达变化,从分子基因水平探讨其神经毒性。

1 材料与方法

1.1 大米暴露及取样

实验动物选用 Sprague-Dawley(SD)健康大鼠,体重 150±5g,购于中国科学院上海实验动物中心。大鼠经过几天适应后开始暴露。暴露温度为 24±1℃,室内光线按光/暗 12h 循环,自由取食。大鼠分为 20d 暴露和 30d 暴露 2 组,每组又分为对照、万山矿山和清镇化工厂 3 组,每组 7 只。对照组以上海市场购买当年产大米喂养,大米中汞

收稿日期: 2004-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20177013);中国科学院知识创新工程(KZCX3-SW-437)

* 责任作者, 教授, whwang@sjtu.edu.cn

含量为 0.004mg/kg; 矿山组以贵州万山矿实验田产的大米喂养, 大米中汞含量为 0.133mg/kg; 化工厂组以清镇化工厂废水排放口下游实验田产的大米喂养, 大米中汞含量为 0.155mg/kg. 大米中加入维生素、植物油和无机盐^[4]. 每只大鼠自由进食, 每日更新. 大鼠分别于喂养 20d 和 30d 后处死, 迅速取出脑组织, 投入液氮中, 转入 -86℃ 的冰箱中保存待用.

1.2 RT-PCR 检测 c-fos mRNA 表达

取适量脑组织, 按照总 RNA 提取试剂盒(由 QIAGEN 公司提供)说明书方法提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度, 重复测定 3 次, OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的比值应在 1.9~2.1 之间, 计算样品总 RNA 浓度. 取适量的总 RNA 进行 RT-PCR, 按 RT-PCR 试剂盒说明书(由 QIAGEN 公司提供)进行. 所用引物为(QIAGEN 公司合成):
c-fos I ATGATGTTCTCGGGTTTCAA,
c-fos II TGACATGGTCTTCACCACTC.
GAPDH I ATGGAAGAAGAAATCGCCGC,
GAPDH II ACACGCAGCTCGTTGTAGAA.

c-fos 和 GAPDH 扩增片断大小为 348bp 和 287bp. 为消除系统及定量误差, c-fos mRNA 的表达水平以相对表达量(c-fos/GAPDH)表示.

1.3 大鼠脑组织汞含量的测定

大米暴露 20d 和 30d 后, 称取 30mg 的大鼠脑组织样品, 由 AMA 254-Automatic solid/liquid Hg Analyzer (Milestone, Italy) 自动完成大鼠脑组织中汞含量的测量.

1.4 统计分析

数据统计采用 t 检验、各组数据均取 $\bar{x} \pm S$.

2 结果

2.1 c-fos RT-PCR 产物电泳

RT-PCR 反应完成后取 15μL PCR 反应液, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR Marker 作分子量标准, 电泳完毕后在紫外灯下照相, 密度扫描分析 PCR 产物带. 结果见图 1. 由图 1 可见, 对照组暴露 20d 和 30d 均没有看见亮带, 而化工厂和矿区大米暴露均有不同程度的亮带.

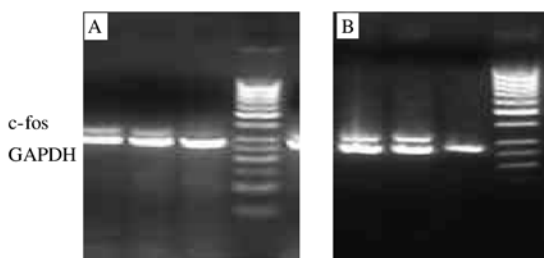


图 1 c-fos RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 Photographs of representative RT-PCR products electrophoresed on 2% agarose gels stained with ethidium bromide

A. 暴露 20d, 从左到右依次为矿区大米暴露、化工厂大米暴露、对照 B. 暴露 30d, 从左到右依次为矿区大米暴露、化工厂大米暴露、对照

2.2 大米暴露大鼠脑 c-fos mRNA 表达

对 c-fos 和 GAPDH 扩增条带进行图象分析, 测得各扩增条带曲线下的光密度值 OD_a 与同一样品下的 GAPDH 扩增条带的光密度值 OD_b 之比, 结果见图 2.

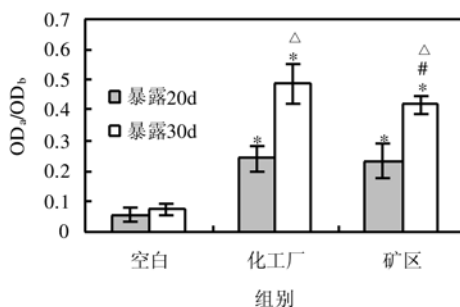


图 2 大米暴露大鼠脑 c-fos mRNA 表达

Fig.2 The expression of c-fos mRNA in brains stimulated by rice

* 与对照组相比 $P < 0.01$; # 暴露同一时间相邻两组相比 $P < 0.05$;

Δ 同一暴露不同时间两组相比 $P < 0.01$

由图 2 可见, 与对照组相比, 化工厂大米和矿区大米暴露 20d 和 30d, 大鼠脑 c-fos mRNA 表达均具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 化工厂大米和矿区大米暴露 30d 与暴露 20d 相比, 大鼠脑 c-fos mRNA 表达均极显著增加 ($P < 0.01$); 这说明实地大米能够极显著诱导大鼠脑 c-fos mRNA 表达, 随着时间的延长表达增加, 这种表达是持续性的.

矿区大米暴露 20d 大鼠脑 c-fos mRNA 表达和化工厂大米暴露 20d 基本一致,矿区大米暴露 30d 大鼠脑 c-fos mRNA 表达比化工厂大米暴露 30d 大鼠脑 c-fos mRNA 表达低,两者之间有显著性差异($P<0.05$).这可能是由于化工厂大米中的汞以甲基汞为主,而矿区以无机汞为主,甲基汞更易透过血脑屏障,对中枢神经系统产生损伤。

2.3 大米暴露后大鼠脑组织中汞蓄积

测量大鼠脑中总汞发现,清镇大米暴露 20d,大鼠脑组织中汞含量为 0.014mg/kg,暴露 30d 为 0.016mg/kg;万山大米暴露 20d,大鼠脑组织中汞含量为 0.024mg/kg,暴露 30d 为 0.036mg/kg.暴露 30d 和 20d 相比,无论是万山组还是清镇组,脑汞含量均极显著的升高($P<0.01$).

3 讨论

研究发现,大鼠暴露汞污染大米后,脑组织中汞的浓度随暴露时间的延长而增加.1997 年,美国国家环境保护局制定标准,将每日摄入汞量限制在 0.1 μ g/(kg·d),较世界卫生组织 0.47 μ g/(kg·d)的标准严格了 4.7 倍.清镇化工厂和万山矿区实验田中大米汞含量分别为 0.155,0.133mg/kg,当地居民的主食以大米为主,长期食用对人体健康的影响值得密切关注。

本实验采用 RT-PCR 方法在转录水平上检测大米暴露大鼠脑 c-fos 基因的表达.结果表明,实验田大米暴露 20d 和 30d 大鼠脑 c-fos mRNA 表达与对照组相比均显著增加,随着时间的延长表达越来越强,表明这种表达是持续性的,不适当的表达将干预细胞核的修复功能而使细胞走向凋亡.已有证据显示,c-fos 的持续表达在细胞形态学死亡前数小时或数天即开始,这似乎可作为细胞的终末分化的标记及死亡的先兆.本实验研究发现,大米暴露 3d 就可以诱导大鼠脑 c-fos mRNA 表达,而此时大鼠脑中汞的含量与对照组相比不具有显著性差异,结合本课题组神经递质和自由基方面研究发现^[5,6],即刻早期基因 c-fos 能够更早反映汞污染大米对神经系统的损伤.初步推测,即刻早期基因 c-fos 能够作为汞神经毒性检测和

评价效应指标^[7,8].环境污染物的评价和效应指标是生物体系与环境因子相互作用所引起的可测定的改变,包括生化、生理、免疫和遗传等多方面的改变.这些改变可发生在整体、器官、细胞、亚细胞和分子水平上.而分子水平上的评价和效应指标不仅可以从分子水平探讨损害机制;而且在准确、敏感地评价早期、低剂量的损害方面有着独特的优势,可为健康质量的退化提供早期的警报,最大限度地减少环境污染物的危害及对公众健康安全的威胁。

4 结论

4.1 我国典型汞污染地区大米能够极显著诱导大鼠脑 c-fos mRNA 表达,并随着时间的延长表达增加,这种表达是持续性的。

4.2 汞污染地区大米在 3d 就能显著诱导大鼠脑 c-fos mRNA 表达,而此时脑汞浓度与对照组相比不具有显著性差异,可以初步推断应用即刻早期基因表达变化早期预报汞神经毒性是可能的。

参考文献:

- [1] Feng X. Mercury in coal of Guizhou China and its environmental impacts [J]. Fuel and Energy Abstracts, 2002,43(4):289.
- [2] 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.
- [3] 丁振华,王文华,瞿丽雅,等.贵州汞污染环境效应及其对生态系统影响 [J]. 环境科学,2004,25(2):111-114.
- [4] Semifamis 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(12):1493-1500.
- [5] 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.
- [6] 胡卫萱.环境汞污染对动物氧化损伤影响的研究 [D]. 上海:上海交通大学,2003.
- [7] 程金平,王文华,贾金平.氯化甲基汞对大鼠海马 c-jun 蛋白表达的影响 [J]. 中国环境科学,2003,23(4):431-434.
- [8] 程金平,王文华,贾金平,等.甲基汞诱导大鼠大脑皮层 c-JUN 蛋白表达 [J]. 中国环境科学, 2004, 24(4):452-455.

作者简介:程金平(1973-),男,江西九江人,讲师,博士,主要从事环境化学、生态毒理学和环境基因组学研究.发表论文 10 余篇。