

环境汞污染粮食暴露对大鼠脑自由基的诱导及共存硒的影响

冀秀玲^{1,2}, 程金平², 王文华², 瞿丽雅³, 赵晓祥¹, 庄惠生¹

(1. 东华大学环境科学与工程学院, 上海 200051; 2. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 3. 贵州省环境科学设计研究院, 贵阳 550002)

摘要: 采用电子顺磁共振(ESR)技术, 研究实地环境汞污染粮食暴露不同时间后在大鼠脑中引发的自由基及脂质过氧化损伤情况, 探讨实地环境汞污染氧化损伤的微观致毒机理. 并对粮食中共存的硒元素作用进行分析. 结果表明, 环境汞污染粮食暴露 7d 后, 大鼠脑中自由基相对强度及脂质过氧化产物 MDA 含量均出现显著升高($p < 0.05$). ESR 图谱分析表明, 环境汞污染粮食暴露诱发大鼠脑中产生烷基自由基($R\cdot$)及羟基自由基($\cdot OH$). 自由基及 MDA 水平在暴露前期($< 90d$)相对稳定, 长暴露 90d 后, 自由基及脂质过氧化产物 MDA 水平有大幅升高(83%, 100%). 大鼠脑中汞、硒元素含量 7d 暴露后均出现显著上升, 2 元素间有较强相关性, 暴露前期大鼠脑中自由基水平相对稳定应与硒的清除作用有关.

关键词: 汞污染; 硒; 自由基; 氧化损伤

中图分类号: X18 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)10-2087-04

Induction of Free Radicals After Dietary Exposure by Mercury Contaminated Rice and Protective Effect of Coexisting Selenium

Ji Xiuling^{1,2}, Cheng Jinping², Wang Wenhua², Qu Liya³, Zhao Xiaoxiang¹, Zhuang Huisheng¹

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

Abstract: Sprague-Dawley rats were reared by environmental mercury contaminated rice to survey the potential health risk of Wanshan mercury mining area. Electron spin resonance (ESR) was introduced to detect the species and the intensities of free radicals, using spin trap 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). The results showed that the mercury-contaminated rice significantly increased the levels of free radicals and MDA in rat brain at 7 days ($p < 0.05$). ESR spectrums showed that the principal spin adducts resulted from the trapping of alkyl free radical ($a_H = 22.7 \times 10^{-4} T \pm 1.6 \times 10^{-4} T$, $a_N = 15.5 \times 10^{-4} T \pm 0.5 \times 10^{-4} T$), and hydroxyl radical. Levels of free radicals and MDA increased slowly until after 90-day exposure period (83%, 100%). Element correlation analysis showed high correlations of mercury and selenium in the brain of rat fed with Wanshan rice, suggesting that the coexisting selenium in rice exhibited antagonistic effects on both mercury accumulation and toxicity. The slight increases of free radicals in rat brain at 7, 20 and 30-day exposure periods should be related with the scavenger effect of Se.

Key words: mercury contamination; selenium; free radicals; oxidative stress

环境汞污染目前已成为人类生存环境的一大公害. 对我国贵州省万山汞矿地区开展的环境化学研究发现, 该地区环境汞污染情况严重^[1,2], 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.

研究表明, 氧化损伤是汞污染毒性作用的重要途径, 是导致生物体细胞凋亡以及一系列神经退行性疾病发生的重要机制^[3,4]. 生物体内氧化水平的变化反映了汞污染对生物体的损伤. 对万山地区实地生长鸭子的研究表明, 环境汞污染的长暴露对鸭子的抗氧化防御系统产生显著影响; 结果还显示, 该地区与汞污染共存的硒元素对汞的毒性有一定拮抗

作用^[5]. 目前, 汞的毒性研究主要集中在实验室化学品汞的毒性研究, 但环境汞污染的复杂性难以在单一化学品暴露实验中显现出来. 为了更准确地揭示环境汞污染诱导生物体产生氧化应激从而导致氧化损伤的毒性作用, 反映万山地区环境汞污染对公众健康的潜在危害, 本实验利用万山汞污染地区粮食对大鼠进行不同时间段的暴露, 采用电子顺磁自

收稿日期: 2005-11-12; 修订日期: 2006-03-28

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-437); 东华大学青年基金项目; 国家自然科学基金项目(20177013)

作者简介: 冀秀玲(1975~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境毒理学和环境化学, E-mail: ling_jx@dhru.edu.cn

旋共振 (ESR) 技术, 以 5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 为自旋捕获剂, 研究环境汞污染粮食暴露后在大鼠脑中引发的自由基以及脂质过氧化情况, 探讨实地环境汞污染在分子水平上的氧化损伤致毒机理, 并对粮食中共存的硒元素作用进行分析。

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, 明暗比 12 h: 12 h 循环, $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下饲养 1 周后开始暴露。暴露时间分为 3d, 7d, 20d, 30d 和 90d。大鼠分为对照和万山 2 组, 每组 7 只。对照组喂以上海市场购买当年产大米, 汞含量为 0.004 mg/kg , 硒含量为 0.027 mg/kg ; 万山组喂以炼矿废水灌溉的实验田中产的大米, 汞含量为 0.137 mg/kg , 硒含量为 0.061 mg/kg 。各组同时添加维生素及微量元素^[6]。每只大鼠自由进食, 饲料每日更新。

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, 一部分用于汞硒含量测定, 一部分转入 -70°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 ESR 测定自由基水平

大鼠脑组织自由基的测量采用 Bruker 公司的 EMX-8 型电子顺次自旋共振仪, 大鼠脑组织匀浆 (DMPO 浓度 100 mmol/L) 4°C , $10\,000\text{ r/min}$ 离心 3min 后, 取 $400\mu\text{L}$ 至石英扁平管中进行测试。ESR 测试条件为: 调制频率 (MF) 100 KHz , 调制幅度 (MA) $3.5 \times 10^{-4}\text{ T}$, 微波功率 (SP) 19.97 mW , 时间常数 (TC) 20.48 ms , 扫场时间 (TI) 41.94 s , 扫场宽度 (SW) $100 \times 10^{-4}\text{ T}$ 。信号峰的高度代表自由基信号的强度。

1.4 MDA 的测定

脂质过氧化产物 MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法^[7]。

1.5 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 大鼠脑组织中汞硒含量

大鼠不同暴露时间后, 脑组织中总汞和硒的含量见表 1。

表 1 大鼠脑组织中总汞及硒的含量¹⁾ / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

Table 1 T-Hg and Se content in rat brain after different exposure periods / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

时间/d	T-Hg		Se	
	上海	万山	上海	万山
3	2.3 ± 1.2	3.1 ± 0.5	110.3 ± 2.0	95.2 ± 24.8
7	2.1 ± 0.2	$6.9 \pm 0.4^{**}$	108.7 ± 63.6	122.9 ± 20.5
20	4.7 ± 0.4	$19.1 \pm 4.0^{**}$	113.9 ± 8.6	$209.2 \pm 1.4^{**}$
30	4.9 ± 0.6	$23.5 \pm 3.0^{**}$	111.7 ± 8.3	$220.7 \pm 23.2^{**}$
90	2.2 ± 0.7	$22.7 \pm 3.3^{**}$	90.9 ± 14.7	$152.7 \pm 21.2^{**}$

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

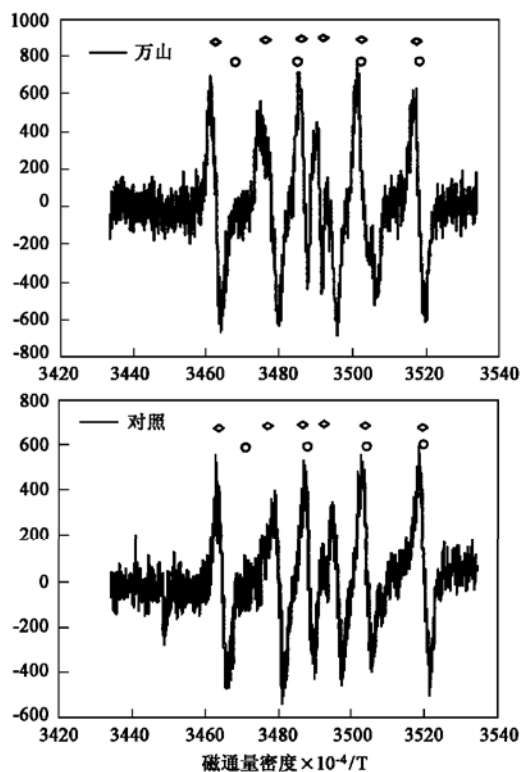
与对照组相比, 7d 暴露时间后, 万山组大鼠脑汞含量出现极显著升高; 随着暴露时间的延长, 大鼠脑组织中汞含量逐渐增加, 20d 后, 万山组大鼠脑组织中汞含量保持在稳定水平。

万山组大鼠脑组织中硒的含量在 7~30d 暴露时间段内持续升高; 90d 时稍有回落。相关性分析表明, 与对照组相比, 万山组大鼠脑中汞硒元素间存在较强相关性。

2.2 自由基信号的变化

2.2.1 ESR 自由基信号谱图

图 1 为大鼠在 20d 暴露时间节点下, ESR 捕捉到的脑组织中自由基信号。



◇为 $\text{R} \cdot$ 自由基加合物六线峰信号位置;
○为 $\cdot\text{OH}$ 自由基加合物四线峰信号位置

图 1 暴露 20d 大鼠脑组织中自由基信号 ESR 谱图

Fig. 1 ESR spectra obtained from rat brain at 20d exposure period

从 ESR 谱图看, 对照组与万山组产生了相似的自由基信号. 大鼠脑组织的 ESR 谱主要由 1 组六线峰组成, 还存在一些强度较弱的小峰. 暴露 20d 万山组大鼠自由基信号强度与对照组相比明显增强.

ESR 谱图信号峰的峰形及超精细常数显示, 主峰应为 DMPO-R 加合物信号 ($\alpha_H = 22.7 \times 10^{-4} T \pm 1.6 \times 10^{-4} T$; $\alpha_N = 15.5 \times 10^{-4} T \pm 0.5 \times 10^{-4} T$), 但与标准图谱相比, 六线峰单峰强度有明显差异. 通过对图谱中一些强度较弱的峰进行分析, 认为有羟基自由基信号峰存在 ($\alpha_H = 15.2 \times 10^{-4} T \pm 0.4 \times 10^{-4} T$; $\alpha_N = 15.5 \times 10^{-4} T \pm 0.5 \times 10^{-4} T$), 谱图显示的信号峰是 R·自由基加合物的六线峰信号与·OH 自由基加合物的四线峰信号叠加的结果.

2.2.2 脑组织中自由基相对强度变化

在 ESR 谱图中自由基信号出现了叠加的现象, 部分单峰的高度为 R·自由基信号与·OH 自由基信号重叠的结果, 因此无法对不同种类的自由基分别进行定量分析, 只能对自由基的总量进行相对强度分析. 自由基信号相对强度的计算公式为^[8]:

$$\text{相对强度} = \frac{\sum h_{xi}}{\sum h_{0i}} \times 100\%$$

h_{xi} : 暴露组大鼠脑 ESR 谱中六线峰各单峰信号高度, 及四线峰各单峰信号高度. 信号发生叠加的单峰高度只计算 1 次. h_{0i} : 对照组大鼠脑 ESR 谱中六线峰各单峰信号高度, 及四线峰各单峰信号高度. 信号发生叠加的单峰高度只计算 1 次.

不同暴露时间点大鼠脑组织中自由基相对强度的变化如图 2 所示.

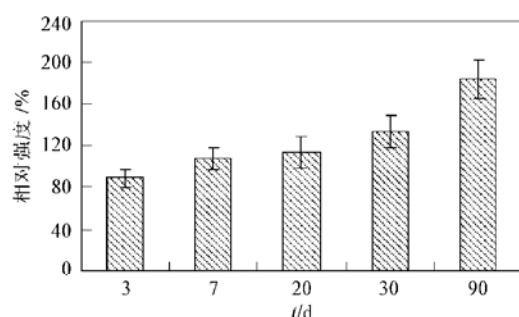


图 2 不同暴露时间大鼠脑中自由基相对强度

Fig. 2 Relative signal intensity of free radicals in rat brain at different exposure periods

大鼠脑中自由基信号相对强度比率显示, 万山组大鼠脑中的自由基信号相对强度随暴露时间延长, 呈现出持续上升的趋势, 暴露 7~20d 时, 自由基强度增长趋势相对缓和; 暴露 90d 后, 万山组大鼠脑中自由基相对强度增长了 83%.

2.3 脑组织中过氧化产物 MDA 含量的变化

汞污染粮食暴露 3d 后, 与对照相比, 万山组大鼠脑组织中 MDA 含量没有表现出显著变化; 暴露 7d 时, 万山组大鼠脑组织中 MDA 含量显著升高 ($p < 0.05$); 暴露 90d 后, 万山组大鼠脑中 MDA 含量升高有极显著意义 ($p < 0.01$).

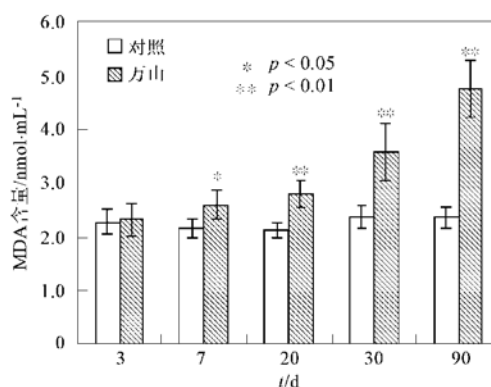


图 3 大鼠脑中 MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes of MDA content in rat brain

3 讨论

实地粮食暴露 7d 后, 大鼠脑组织中汞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; 而长期饲喂 90d 后, 大鼠脑中的总汞含量与 30d 相比略有回落. 对大鼠脑组织中硒含量的分析表明, 暴露 7d 后, 万山组大鼠脑组织中硒含量也出现了显著升高 ($p < 0.05$). 整个暴露过程中, 硒含量在万山组大鼠脑中的变化情况与汞的变化情况相似. 进一步的 Hg-Se 相关性分析表明, 万山组大鼠脑中汞硒元素间存在着较强的相关性 ($R = 0.89$), 而对照组汞硒元素间则不存在相关关系 ($R = -0.09$). 相关性分析结果表明, 硒元素将一定程度上影响万山地区环境汞污染的代谢及毒性作用过程^[5,9].

ESR 结果直接表明, 汞污染地区粮食饲喂大鼠 7d 后, 在不同的暴露时间点都引起了大鼠脑组织中自由基水平的升高. 从自由基种类上看, 汞污染粮食暴露后, 大鼠脑组织中脂类自由基和羟基自由基的生成都有增加. 自由基是体内正常代谢的中间产物, 参与体内许多有益的生理反应过程, 但是, 过多的自由基在体内产生又会引起有害的病理反应. 自由基的增加首先会在体内诱发一系列的自由基链式反应, 引起脂质过氧化等氧化损伤的发生. 在脂质过氧化链式反应中, 不同种类的自由基在过氧化过程中起着不同的作用^[10]. 脂质过氧化链式反应主要由 3

个步骤:链反应启动,链增长及链终止.活性氧尤其是羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 是体内脂质过氧化反应的主要引发剂,而脂类自由基在链增长反应中起着重要作用.由于 $\text{R}\cdot$ 自由基的脂溶性,与羟基自由基,超氧自由基等水溶性自由基相比, $\text{R}\cdot$ 自由基对生物体的毒性更大,因为生物分子大多是脂溶性的, $\text{R}\cdot$ 自由基可以很容易的与生物大分子的活性位点相结合,引起生物体内的脂质化反应^[11].活性氧自由基如羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 等具有很强的氧化性,能够强烈地攻击抗氧化物或抗氧化酶等生物分子,使酶活性受到抑制,抗氧化剂含量下降.除了在脂质过氧化反应中的重要作用外,活性氧自由基同时在细胞内信号传导过程中也起着重要作用,可以作为一种第二信使,调节转录因子活化、细胞凋亡等生理过程^[12].汞污染粮食诱导体内自由基(ROS, $\text{R}\cdot$)增加可能是导致各种细胞损伤以至凋亡的重要过程,是汞神经毒性机制的重要环节.

大鼠脑组织中脂质过氧化水平的研究也表明,汞污染粮食暴露后,大鼠脑组织中过氧化水平升高,表明自由基升高引起了机体的氧化损伤.

从大鼠体内汞的蓄积情况看,在20d,30d暴露时间点,万山组大鼠脑中汞含量已达到最高水平;对应的脑中自由基水平和MDA含量却并未在20d暴露后即达到或接近最高值,而是维持在一定的升高幅度内.自由基水平在暴露前期(<90d)的相对稳定可能与汞在大鼠体内的蓄积有关.Reddy等人的研究表明^[13],对大鼠补充硒及维生素E,可以降低或消除肺内由于运动产生的氧自由基和脂质自由基.同时,对在万山矿区实地环境下生长的鸭子进行的研究表明^[5],虽然万山矿区生长的鸭子体内汞的含量远远高于对照组,但由于体内共蓄积的硒元素的作用,万山地区鸭子体内的抗氧化酶活性以及还原性谷胱甘肽的含量均明显高于对照组.硒可以通过与汞结合,或在体内形成多种自由基清除物质,如含硒谷胱甘肽,降低汞的毒性及其引发的自由基的产生.

虽然硒能在一定程度上减轻组织的损伤,但长时间的刺激使体内自由基不断蓄积,抗氧化系统受到抑制,不可避免地会导致机体内氧化损伤的发生.

4 结论

实地环境汞污染粮食暴露大鼠脑组织中汞硒元素间存在较强的相关性,对照组大鼠脑中汞硒元素无相关性存在.ESR结果表明,汞污染粮食暴露导致大鼠脑中 $\text{R}\cdot$ 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 自由基增加.暴露初

期,粮食中的硒元素对体内自由基的升高及组织的氧化损伤起到一定的缓解.而长期的汞污染粮食暴露使体内自由基水平急剧升高,最终导致机体内氧化状态的恶化.

致谢:感谢上海交通大学ESR分析测试室赵成学教授,窦红艳博士在ESR图谱分析过程中的指导和帮助.

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] 丁振华, 王文华, 瞿丽雅, 等. 贵州万山汞矿区汞的环境污染及对生态系统的影响[J]. *环境科学*, 2004, **25**(2): 111~114.
- [3] Giles N M, Giles I G, Holleyb J E, *et al.* Targeting oxidative stress-related diseases: organochalcogen catalysts as redox sensitizers [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, **66**: 2021~2028.
- [4] Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J C, *et al.* Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**: 3972~3980.
- [5] Ji X L, Hu W X, Cheng J P, *et al.* Oxidative stress on domestic ducks (Shaoxing duck) chronically exposed in a Mercury-Selenium coexisting mining area in China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, **64**(2): 171~177.
- [6] Semlramis 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.
- [7] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction [J]. *Anal. Biochem.*, 1979, **95**: 351.
- [8] Guo Q, Rimbach G, Moini H, *et al.* ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids [J]. *Toxicology*, 2002, **179**: 171~180.
- [9] 章佩群, 陈春英, 赵九江, 等. 不同汞暴露水平地区鱼组织中汞和硒及其它元素的相关性 [J]. *环境科学*, 2004, **25**(4): 149~154.
- [10] Gardner H W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1989, **7**(1): 65~86.
- [11] Luo G M, Qi D H, Zheng Y G, *et al.* ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron [J]. *FEBS Letters*, 2001, **492**(1~2): 29~32.
- [12] Tsukamoto M, Tampo Y, Sawada M, *et al.* Paraquat-Induced Oxidative Stress and Dysfunction of the Glutathione Redox Cycle in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, **178**(2): 82~92.
- [13] Reddy K V, Kumar T C, Prasad M, *et al.* Pulmonary Lipid Peroxidation and Antioxidant Defenses During Exhaustive Physical Exercise: The Role of Vitamin E and Selenium [J]. *Nutrition*, 1998, **14**(5): 448~451.