

甲基汞对大鼠脑即刻早期基因 *c-jun* mRNA 表达影响

程金平¹, 王文华¹, 瞿丽雅², 贾金平¹, 郑敏³, 林志新³

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 贵州省环境保护科学研究所, 贵阳 550002; 3. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 为了探讨甲基汞神经毒性早期预报指标和信息传递分子机制, 本文应用 RT-PCR 方法研究了不同浓度甲基汞暴露不同时间后, 大鼠脑中即刻早期基因 *c-jun* mRNA 表达变化(对照组为 0.9% 生理盐水, 暴露组浓度分别为 0.05、0.5、5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 取样时间分别为 20、60、240、1440 min)。结果表明大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达优先于汞的蓄积, 大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达变化对于甲基汞神经毒性具有早期预报作用, 即刻早期基因 *c-jun* 参与了甲基汞对中枢神经系统损害的毒性过程。

关键词: 甲基汞; *c-jun*; 基因表达; RT-PCR; 早期预报

中图分类号: Q523, R153.13, X18 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)04-0159-04

Effect of Methylmercury on Expression of Immediate Early Gene *c-jun* mRNA in Rat Brain

CHENG Jin-ping¹, WANG Wen-hua¹, QU Li-ya², JIA Jin-ping¹, ZHENG Min³, LIN Zhi-xin³

(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; 3. Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In order to probe into the early prediction molecular index and the signal transduction molecular mechanism of methyl mercury chloride (MMC) neurotoxicity, the expression of *c-jun* mRNA in rat brains induced by different concentration MMC for different times were observed by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods (the control group was physiological saline of 0.9%, the concentrations of expose groups were 0.05, 0.5, 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively, the sampling times were 20, 60, 240, 1440 min). The result showed the expression of *c-jun* mRNA in rat brains was prior to the accumulation of mercury, and the expression of *c-jun* mRNA in rat brains could early predict the neurotoxicity of MMC. IEG(*c-jun*) participated in the toxicity process of injury by MMC.

Key words: methyl mercury chloride; immediate early gene; *c-jun*; gene expression; RT-PCR; early prediction

汞污染和汞中毒是一个久远而现实的问题, WHO 和各国政府均将其列为首先考虑的污染物。目前国内外对汞毒性研究已由大剂量急性暴露研究发展到更接近实际环境的长期暴露和低剂量水平的研究, 所采用的研究对象已由生物整体、器官和组织深入到细胞和亚细胞以至更灵敏的分子水平。在本课题组研究的基础上^[1~4], 本文应用 RT-PCR 方法, 研究不同浓度氯化甲基汞 (MMC) 暴露不同时间后, 大鼠脑中即刻早期基因 *c-jun* mRNA 表达变化, 以便探讨甲基汞神经毒性早期预报指标和甲基汞神经毒性信息传递分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物暴露

选取健康 SD 大鼠, 体重 $200 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$, 由中科院上海实验动物中心提供。实验前所有待试动物在同一环境(室温, 无强光及强噪音刺激, 充足的食物和

饮水) 饲养数天, 去除过于活跃或呆滞者。将健康大鼠随机分为 16 组分别标记如下, 每组 6 只, 雌雄各半, 一次性皮下注射 MMC 进行暴露:

D1 T1 D1 T2 D1 T3 D1 T4

D2 T1 D2 T2 D2 T3 D2 T4

D3 T1 D3 T2 D3 T3 D3 T4

D4 T1 D4 T2 D4 T3 D4 T4

其中: D1 为空白 即注射 0.9% 生理盐水;

D2: 注射浓度为 0.05 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MMC;

D3: 注射浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MMC;

D4: 注射浓度为 5.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MMC。

T1: 20 min 后取样; T2: 60 min 后取样;

T3: 240 min 后取样; T4: 1440 min 后取样。

收稿日期: 2003-10-16; 修订日期: 2003-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20177013); 上海交通大学 985 工程资助项目(113516001)

作者简介: 程金平(1973~), 男, 博士, 上海交通大学环境科学与工程学院, 讲师, 主要从事环境基因组学方面研究。

SD大鼠达到暴露时间后,股动脉取血处死.在冰盘内迅速除去大鼠脑颅骨,剥离硬脑膜及软脑膜,取出完整的脑组织.取部分脑组织迅速投入液氮中然后转入-86℃的冰箱中保存待用.

1.2 RT-PCR

取适量脑组织,按照总RNA提取试剂盒(由QIGEN公司提供)说明书方法进行提取总RNA,经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之比值应在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QIGEN公司提供)进行.用保守基因(GAPDH)做参照,所用引物为(QIAGEN公司合成):

c-jun I ATGACTGCAAAGATGGAAAC,
c-jun II TTGAAGTTGCTGAGGTTGGC
GAPDH I ATGGAAGAAGAAATCGCCGC
GAPDH II ACACGCAGCTCGTTGTAGAA.

*c-jun*和GAPDH扩增片断大小分别为530bp和287bp.反应完成后取15μLPCR反应液,经2%琼脂糖凝胶电泳,用PCRMarker(由Sangon公司提供)作分子量标准.电泳完毕后在紫外灯下观察照相,密度扫描分析PCR产物带.为消除系统及定量误差,*c-jun*mRNA的表达水平以相对表达量即*c-jun*/GAPDH的百分数来计算^[5~7].

表1 大鼠脑中汞的浓度¹⁾/mg·kg⁻¹

Table 1 The mercury concentrations in brains/mg·kg⁻¹

time/min	0(D1)	0.05mg·kg ⁻¹ (D2)	0.5mg·kg ⁻¹ (D3)	5mg·kg ⁻¹ (D4)
20(T1)	(0.0044±0.0002)	(0.0044±0.0009)	(0.0173±0.0023) ³⁾	(0.5266±0.1104) ³⁾
60(T2)	(0.0041±0.0005)	(0.0064±0.0018) ²⁾	(0.0302±0.0044) ³⁾	(0.4725±0.1115) ³⁾
240(T3)	(0.0037±0.0010)	(0.0147±0.0039) ³⁾	(0.1196±0.0286) ³⁾	(1.2840±0.1400) ³⁾
1440(T4)	(0.0044±0.0009)	(0.0100±0.0010) ³⁾	(0.0929±0.0119) ³⁾	(1.1402±0.2125) ³⁾

1) 数据统计采用t检验,各组数据均取 $\bar{x} \pm S$ 表示,n=5;2) 与对照组相比p<0.05,3) 与对照组相比p<0.01.

2.2 甲基汞对大鼠脑即刻早期基因 *c-jun* mRNA 表达的影响

(1) *c-jun* RT-PCR 产物电泳见图1.

DNA Marker sizes were 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750-bp from bottom to top. 图1A:对照组(D1)大鼠脑*c-jun*RT-PCR产物电泳图,从左到右依次为D1T4、D1T3、D1T2、D1T1;图1B:D2浓度暴露大鼠脑*c-jun*RT-PCR产物电泳图,从左到右依次为D2T1、D2T2、D2T3、D2T4;图1C:D3浓度暴露大鼠脑*c-jun*RT-PCR产物电泳图,从左到右依次为D3T1、D3T2、D3T3、D3T4;图1D:D4浓度暴

1.3 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 脑中汞的蓄积

称取约30mg的大鼠脑组织样品,放入样品舟内,由AMA254-Automaticsolid/liquidHgAnalyzer(Milestone,Italy)自动完成,结果如表1.由表1可以看出,在20min时0.5mg·kg⁻¹剂量和60min时0.05mg·kg⁻¹剂量,汞就已开始在脑中显著蓄积,说明MMC极易穿过血脑屏障,对脑组织有很强亲和力.在如此短的时间和如此低的剂量下,汞在脑中的蓄积情况目前尚未见到报道.相同时间条件下MMC在脑中的蓄积量随剂量增加而升高.一次性MMC暴露后,MMC在脑中的蓄积速度与暴露剂量有一定的依赖关系,剂量越高,蓄积越快;这可能是因为浓度越高,扩散速度越快,于是进入脑的速度也越快的缘故.

一次性注射MMC暴露后汞在脑中的蓄积量随时间而变化,240min前随暴露时间增加而增加,240min达到最大,暴露1440min,0.05mg/kg剂量已开始显著下降,其余两个剂量也已开始表现出下降趋势.除D2T1组与对照组相比不具有显著性差异外,其它各暴露组脑中汞的蓄积均显著高于对照组.

露大鼠脑*c-jun*RT-PCR产物电泳图,从左到右依次为D4T1、D4T2、D4T3、D4T4.

(2) 甲基汞对大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达的影响,结果见表2.

对*c-jun*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A_a和同一样品下的GAPDH扩增条带的光密度值A_B,结果用A_a/A_B百分数表示.

从表2可以看出,对照组*c-jun*mRNA表达非常的弱,而随着时间的延长,*c-jun*mRNA表达越来越弱,在T1时间表达最强,在T4时间表达最弱,T4与T1之间有极显著性差异(p<0.01),相邻之间没

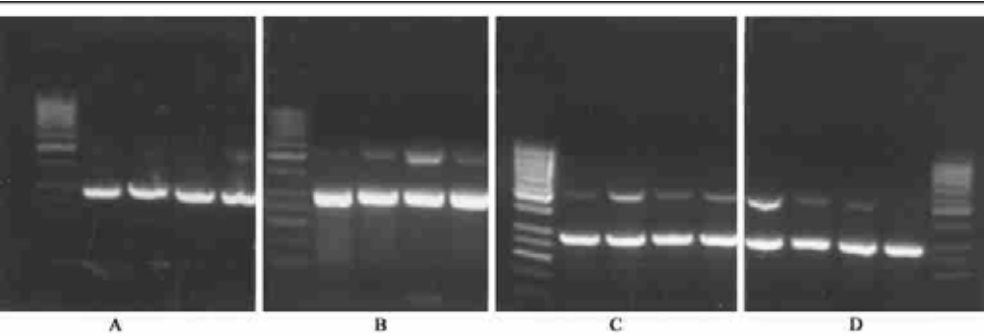


图 1 *c-jun* RT-PCR 产物电泳图

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

表 2 甲基汞对大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达的影响¹⁾

Table 2 The effects of MMC on the expression of *c-jun* mRNA in rat brains

time/ min	0 (D1)	0. 05 mg·kg ⁻¹ (D2)	0. 5 mg·kg ⁻¹ (D3)	5 mg·kg ⁻¹ (D4)
20(T1)	(10 ±3)	(15 ±1) ²⁾	(34 ±14) ³⁾	(66 ±3) ³⁾
60(T2)	(6 ±4)	(21 ±10) ²⁾	(63 ±25) ³⁾	(43 ±16) ³⁾
240(T3)	(5 ±4)	(46 ±21) ³⁾	(29 ±10) ³⁾	(36 ±15) ³⁾
1440(T4)	(1 ±0 .7)	(23 ±8) ³⁾	(37 ±16) ³⁾	(28 ±9) ³⁾

1) 数据统计采用 *t* 检验 ,各组数据均取 $\bar{x} \pm s$ 表示 , *n* = 5 ; 2) 与对照组相比 *p* < 0 .05 ; 3) 与对照组相比 *p* < 0 .01 .

有显著性差异,这表明对照组在 T4 时间后 *c-jun* mRNA 表达开始趋于稳定.通过实验发现,大鼠未注射生理盐水和甲基汞前 *c-jun* mRNA 几乎不表达,凝胶图像分析系统不能分析出其表达量.所以可以推断,这种现象可能是由于在注射过程中短暂的应激效应诱导了大鼠脑 *c-jun* mRNA 的瞬时表达,60 min 后开始下降,1440 min 后慢慢恢复正常.

各暴露组与对照组相比均具有显著性差异,这说明甲基汞显著诱导了大鼠脑即刻早期基因 *c-jun* mRNA 表达.在各浓度暴露下,随着时间的增加,大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达呈现先升高后下降趋势.暴露组大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达随浓度的增加, mRNA 表达到达高峰时间越早.在 D2 浓度暴露时, T3 时间表达最强, T3 与 T1 之间有显著性差异(*p* < 0.05),相邻之间没有显著性差异.在 D3 浓度暴露下, T2 时间表达最强, T3 与 T2 之间有显著性差异(*p* < 0.05).在 D4 浓度暴露下, T1 时间表达最强,相邻各组之间有极显著性差异(*p* < 0.01).

3 讨论

甲基汞属于高神经毒物,具有脂溶性,易透过血脑屏障或胎盘屏障进入脑组织,引起急性或慢性甲基汞中毒.从甲基汞在脑中的蓄积情况发现,在体重剂量为 0.05 mg/kg MMC 暴露下大鼠脑中的甲基汞蓄积与对照组相比不具有显著性差异,而大鼠

脑 *c-jun* mRNA 表达与对照相比具有显著性差异;研究还发现在 MMC 暴露下,大鼠脑中汞的蓄积在 T3 时均最大,而 *c-jun* mRNA 表达最强时间除 D2 浓度为 T3 时间外,其它均比 T3 时间提前;从这两点可以看出大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达优先于汞的蓄积,即并不是由于汞到了脑之后才诱导了 *c-jun* mRNA 表达,而是在汞还未到达脑之前大鼠脑 *c-jun* mRNA 就开始表达,这也说明了汞的神经毒性存在一个信息传递过程.由这些结果可以认为大鼠脑 *c-jun* mRNA 表达对于甲基汞神经毒性具有早期预报作用.

本课题组研究了甲基汞急性暴露大鼠神经递质的变化^[8],通过研究发现,0.05 mg/kg 暴露 20 min,大鼠脑、肝、肾 3 种组织中胆碱酯酶(AChE)和乙酰胆碱(ACh) 与对照组相比均有显著变化(*p* < 0.05),而在此情况下,脑中总汞含量没有显著变化,即可以认为此时甲基汞尚未突破血脑屏障进入脑中,因而乙酰胆碱的变化和乙酰胆碱酯酶的变化也具有一定的提前性.通过对大鼠氧化损伤研究发现^[9,10],在 MMC 0.05 mg/kg 剂量下,一次性暴露 24 h 内各时间点 MDA(丙二醛)、SOD(超氧化物歧化酶)含量与对照组相比均无显著变化,各指标的变化均滞后于汞在脑中的蓄积.

c-jun 的第三信使假说认为^[11~14],在神经系统对内源及外源信号的应答过程中,第一级神经元的

兴奋引起神经递质的分泌,其作为第一信使,作用于靶细胞的细胞膜,再由跨膜转导机制将信号传入细胞内,激活了胞内的第二信使,引起靶细胞特定的反应,在引起细胞瞬时反应的同时,也可以激活即刻早期基因 *c-jun* 的转录,该转录生成的 *c-jun* mRNA 逸出胞核到胞浆翻译成 JUN 等磷蛋白,重新进入核内,组成不同的二聚体,作用于靶基因上的 AP-1 结合位点(TGACTCA)等,调节靶基因的表达,正是这些快速生成的核蛋白把第一和第二信使传来的信息与靶基因表型的改变偶联起来,因此被称为核内第三信使。即刻早期基因产物—转录因子可能作为信号传递通路的第三信使调节靶基因的表达,导致细胞表型的改变,从而调控细胞乃至神经系统的生理反应。由此可见,*c-jun* mRNA 表达变化在甲基汞神经毒性分子机制中具有重要的作用。

参考文献:

- [1] 程金平,王文华,贾金平. 氯化甲基汞对大鼠脑 *c-fos*、*c-jun* 基因表达的影响[J]. 环境科学, 2003, 24(1): 52 ~ 56.
- [2] 程金平,王文华,贾金平. 甲基汞神经毒性检测和评价效应指标——即刻早期基因研究[J]. 上海环境科学, 2002, 21(9): 561 ~ 563.
- [3] 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.
- [4] 胡卫萱,王文华,杨柳,贾金平,刘建华. 甲基汞暴露下汞在脑中的积累及氧化损伤[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(3): 167 ~ 169.
- [5] Peng Y, Xu R-H, Mei J-M, Li X-P, Yan D, Kung, H-F, Phang J M. Neural inhibition by *c-Jun* as a synergizing factor in bone morphogenetic protein 4 signaling[J]. Neuroscience, 2002, 109(4): 657 ~ 664.
- [6] Regalia Jen, Cai Fang, Helke Cinda. Streptozotocin-induced diabetes and the neurochemistry of vagal afferent neurons[J]. Brain Research, 2002, 938(1-2): 7 ~ 14.
- [7] Ho Li-Lun, Chen Wei-Jen, Lir-Shiau, Shoen Yn, Lin Jenn-Kun. Pentar-O-galloyl- β -D-glucose inhibits the invasion of mouse melanoma by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulation of activator protein-1 [J]. European Journal of Pharmacology, 2002, 453(2,3): 149 ~ 158.
- [8] 杨柳. 环境汞污染对动物某些神经递质量影响的研究[D]. 上海交通大学硕士论文, 2003.
- [9] 胡卫萱. 环境汞污染对动物氧化损伤影响的研究[D]. 上海交通大学硕士论文, 2003.
- [10] 胡卫萱,王文华,贾金平. 甲基汞在脑组织中的积累和脂质过氧化作用[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(5): 331 ~ 333.
- [11] Hiroyuki Katano, Atsuo Masago, Shigenori Harada, Akira Iwata, Kazuo Yamada. Differential induction of immediate early gene mRNAs following cryogenic and impact trauma with/ without craniotomy in rats [J]. Brain Research, 1998, 800: 69 ~ 77.
- [12] Sigrun Knochel, Annette Schuler Metz, Walter Knochel. *c-Jun* (AP-1) activates BMP-4 transcription in *Xenopus* embryos[J]. Mechanisms of Development, 2000, 98: 29 ~ 36.
- [13] Ayumi Ozeki, Ikuyo Tsukamoto. Retinoic acid repressed the expression of *c-fos* and *c-jun* and induced apoptosis in regenerating rat liver after partial hepatectomy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1450: 308 ~ 319.
- [14] Becquet D, Guillaumond F, Bosler O, Franc A M, Bois-Bellan. Long-term variations of AP-1 composition after CRH stimulation: consequence on POMC gene regulation [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 175: 93 ~ 100.