

• 论 著 •

牛磺酸对甲基汞染毒大鼠脑皮质 Nrf2 及 HO-1、 γ -GCS、Gpx-1 表达的影响

李乐慧, 徐兆发, 奉姝, 刘巍, 魏衍刚, 徐斌, 邓宇, 杨海波

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究甲基汞对大鼠脑皮质 Nrf2 及 HO-1、 γ -GCS、Gpx-1 表达的影响及牛磺酸的干预作用。方法 Wistar 大鼠 40 只按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为 (1) 对照组、(2) 低剂量染甲基汞组、(3) 高剂量染甲基汞组、(4) 牛磺酸干预组, 染毒前, 1~3 组大鼠只给予皮下注射生理盐水, 第 4 组大鼠给予皮下注射 1 mmol/kg 牛磺酸; 2 h 后, 第 1 组仍腹腔注射生理盐水, 第 2 组大鼠腹腔注射 4 μ mol/kg 氯化甲基汞, 3、4 组大鼠则腹腔注射 12 μ mol/kg 氯化甲基汞溶液, 每周染毒 5 次, 隔日干预 1 次, 连续 4 周。最后一次染毒 24 h 后, 处死大鼠, 分离大脑皮质, 用冷原子吸收法检测汞含量, Real-time PCR 和 Western blotting 法测定 Nrf2、HO-1、 γ -GCS、GPx-1 的 mRNA 和蛋白的表达。结果 与对照组比较, 低、高甲基汞组中汞含量、HO-1 和 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高; 高甲基汞组 Nrf2 的 mRNA 和蛋白表达显著升高, Gpx-1 的表达显著降低。与高甲基汞组比较, 牛磺酸干预组大鼠大脑皮质中汞含量无明显差异; Nrf2、HO-1 和 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白表达明显降低, Gpx-1 的 mRNA 和蛋白表达明显上调。结论 甲基汞可能通过激活 Nrf2 及其下游靶基因 HO-1 和 γ -GCS, 抑制抗氧化酶 Gpx-1 诱发氧化应激, 而牛磺酸对其具有拮抗作用。

关键词: 甲基汞 (MeHg); 核转录因子 Nrf2; 牛磺酸; 氧化损伤; 活性氧 (ROS)

中图分类号: R992 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2013)03-0163-04

Effect of taurine on expression of Nrf2, HO-1, γ -GCS and Gpx-1 in cerebral cortex of methylmercury exposed rat

LI Yue-hui, XV Zhao-fa, FENG Shu, LIU Wei, WEI Yan-gang, XV Bin, DENG Yu, YANG Hai-bo

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of methylmercury on the expression of Nrf2, HO-1, γ -GCS and Gpx-1 in rat brain cortex and the intervention of taurine on it. **Methods** Fourty Wistar rats were randomly divided into four groups by weight, they were (1) control group, (2) low-dose of methylmercury group, (3) the high-dose of methylmercury group and (4) taurine intervention group. Before methylmercury exposure, 1—3 group rats were subcutaneously injected with 0.9% NaCl in advance, while the rats in group 4 were injected with 1 mmol/kg of taurine subcutaneously. Two hours later, the control group was intraperitoneally given 0.9% NaCl, group 2 was intraperitoneally given 4 μ mol/kg of methylmercury chloride, and groups 3 and 4 were given 12 μ mol/kg of methylmercury chloride i. p. five times a week for four weeks, meanwhile the taurine intervention was also given every other day 24 hours later after last exposure, the rats were killed and the cerebral cortices were taken for detecting the contents of Hg by cold vapor atomic absorption, the mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, γ -GCS, GPx-1 were determined with Real-time PCR and Western blotting methods. **Results** Compared with control group, the mRNA and protein expressions of HO-1 and γ -GCS, and the mercury content in brain cortex of rat, in low-and high-dose methylmercury groups mercury content were significantly elevated the mRNA and protein expressions of Nrf2 in high-dose methylmercury group were significantly higher, while the expression of Gpx-1 was obviously lowered. Although the mercury content of brain cortex in rats of taurine intervention group showed no significant difference with MeHg-exposed groups but the mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1 and γ -GCS were all significantly reduced, Gpx-1 was significantly up-regulated. **Conclusion** The results suggested that methylmercury might activate Nrf2 and its downstream target genes such as HO-1 and γ -GCS and suppress antioxidant GPx-1, thereby induces oxidative stress, while taurine showed antagonistic effect on it.

Key words: methylmercury (MeHg); nuclear transcription factor Nrf2; taurine; oxidative damage; reactive oxygen species (ROS)

收稿日期: 2012-12-20; 修回日期: 2013-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81172631)

作者简介: 李乐慧 (1985—), 女, 硕士, 主要从事重金属中毒机制及防治研究。

通讯作者: 徐兆发, 教授, 博士生导师, E-mail: zfxu@mail.cmu.edu.cn.

甲基汞 (methylmercury, MeHg) 是一种高神经毒性的环境污染物^[1], 具有脂溶性、易通过血脑屏障的特点^[2], 人类主要通过摄食被甲基汞污染的水产类而出现神经系统损伤。有研究表明氧化应激在甲基汞诱发的神经毒性机制中发挥着至关重要的作用。Nrf2 (NF-E2-related factor2) 是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子, 生理状态下它与胞浆蛋白 Keap1 (Kelch-like ECH associated protein1) 结合处于相对抑制状态^[3]。在氧化应激源的作用下, Nrf2 与 Keap1 解偶连后转移入核, 与 Maf 蛋白以异二聚体的形式结合后识别抗氧化反应元件 ARE (antioxidant response element), 与其启动子位点结合, 启动 ARE 调控的 II 相解毒酶及其下游抗氧化酶基因的表达, 增加细胞的氧化应激能力, Nrf2 是调控细胞对抗外来异物和氧化损伤的关键转录因子, Nrf2 缺失或激活障碍, 会引起细胞对应激源的敏感性增高。

牛磺酸 (taurine, Tau) 是一种由含硫氨基酸转化而来的 β -氨基酸, 广泛存在于动物及人体细胞中^[4]。Tau 具有多种生理功能, 如具有细胞保护、抗脂质过氧化对抗各种化学物质对细胞的损害等^[5]。

本实验拟通过体内实验观察甲基汞对大鼠脑皮质汞含量、Nrf2、HO-1、 γ -GCS、Gpx-1 表达的影响以及牛磺酸的干预作用, 进而深入探讨甲基汞致大鼠脑皮质氧化应激的作用机制, 为甲基汞中毒的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

722 型分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), F732 型测汞仪 (上海华光仪器仪表厂), 高速分散均质机 (上海标本模型厂), 高速离心机 (上海医用分析仪器厂), KS-150 型超声波细胞粉碎机 (宁波科生仪器厂), 272PCR 扩增仪 (新加坡 Applied biosystems 公司), 水平电泳槽、WD-9405B 型水平摇床 (北京市六一仪器厂), 1680 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), VE-186 垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司), GDS-8000 电泳凝胶成像分析系统 (美国 UVP 公司), 氯化甲基汞 (CH_3HgCl , 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 牛磺酸 (北京奥博星生物技术责任有限公司), Real-Time PCR 试剂盒 (TaKaRa 生物科技有限公司), ECL 显影试剂盒 (南京凯基生物科技有限公司)。

1.2 动物分组及染毒

选择健康清洁级 Wistar 大鼠 40 只, 体重 (180 ± 10) g, 雌雄各半, 由中国医科大学实验动物部提

供, 实验动物许可证号为 SYXK (辽) 2008—0005。正式实验前适应性饲养 1 周。将实验动物按体重随机分成 4 组, 每组 10 只, 分别为 (1) 对照组、(2) 低剂量甲基汞组、(3) 高剂量甲基汞组、(4) 牛磺酸干预组。第 1~3 组大鼠只给予皮下注射生理盐水, 第 4 组大鼠给予皮下注射 1 mmol/kg 牛磺酸。2 h 后, 第 1 组仍腹腔注射生理盐水, 第 2 组大鼠腹腔注射 4 $\mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞溶液, 第 3、4 组大鼠则腹腔注射 12 $\mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞溶液, 每周染毒 5 次, 隔日干预 1 次, 连续 4 周, 注射容量均为 5 ml/kg。

1.3 样本采集与测定指标及方法

最后一次染毒 24 h 后, 将大鼠用水合氯醛麻醉, 心脏放血后, 断头在冰浴下迅速分离大脑皮质, 采用冷原子吸收法测定汞含量^[6]。

1.3.1 总 RNA 提取和 Real-time PCR 测定 mRNA 表达 按照 TaKaRa 试剂盒说明书提取总 RNA, 按照 Real-time PCR 试剂盒说明书逆转录出 cDNA, 以逆转录产物为模板扩增检测 Nrf2、HO-1、 γ -GCS、Gpx-1 的基因表达, β -actin 为内参照基因, 引物序列见表 1。

表 1 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 进行 PCR 扩增的引物序列

名称	序列 (5'-3')
Nrf2	正义 GAGACGGCCATGACTGAT
	反义 GTGAGGGGATCGATGAGTAA
HO-1	正义 AAGAGGCTAAGACCGCCTTC
	反义 GCATAAATTCCTGCTCCAC
γ -GCS	正义 TCTGACACGTAGCTCGGTAAA
	反义 TTGGCCACTATCTGCCCAA
Gpx-1	正义 CGGGGCTGCTGCTGCTCGGCTTC
	反义 GACAGCAGGTTTCAATGTCAGGC
β -actin	正义 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	反义 GACTCATCTACTCTGCTTGCTG

PCR 的反应条件为 95℃ 30 s 预变性, 95℃ 5 s 变性, 60℃ 20 s 复性, 扩增 40 个循环。反应结束后确认 Real time PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线, 计算目的基因的相对表达量。

1.3.2 Western blotting 测定蛋白表达 取 50~100 mg 脑组织并在冰上剪碎, 应用蛋白变性裂解液提取蛋白, BCA 方法检测蛋白浓度, 蛋白质变性, SDS-PAGE 后电转移到 PVDF 膜上, 一抗 (1:1000 稀释), 4℃ 封闭过夜, TBST 洗膜, 二抗 (1:4000 稀释) 室温孵育 2 h, 加 ECL 发光液发光, 暗室显影 1~5 min。

1.4 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 软件进

行统计学分析。采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 Q 检验 (Students-Newman-Keuls, SNK)。

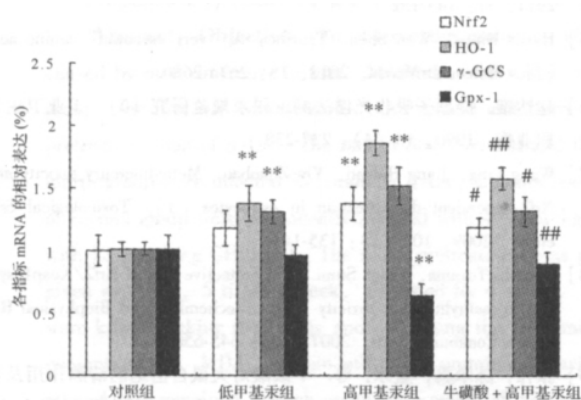
2 结果

2.1 大鼠脑汞含量

大鼠染毒 4 周后, 与对照组比较, 低、高甲基汞组大鼠大脑皮质中汞含量分别升高 16.38 倍和 63.38 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与高剂量甲基汞染毒组比较, 牛磺酸干预组大鼠大脑皮质中汞含量差异无统计学意义。

2.2 大鼠大脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 mRNA 的表达

各组大鼠脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 mRNA 的表达见图 1。与对照组比较, 低甲基汞组 Nrf2 mRNA 无明显变化, 高甲基汞组则见明显升高 ($P < 0.01$); 低、高甲基汞组 HO-1 和 γ -GCS mRNA 表达均有显著性升高 ($P < 0.01$); 低甲基汞组 Gpx-1 的 mRNA 表达无大变化, 高甲基汞组表达显著下降 ($P < 0.01$)。与高甲基汞组比较, 牛磺酸干预组 Nrf2、HO-1 和 γ -GCS 的 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 而 Gpx-1 的 mRNA 表达则明显升高 ($P < 0.01$)。



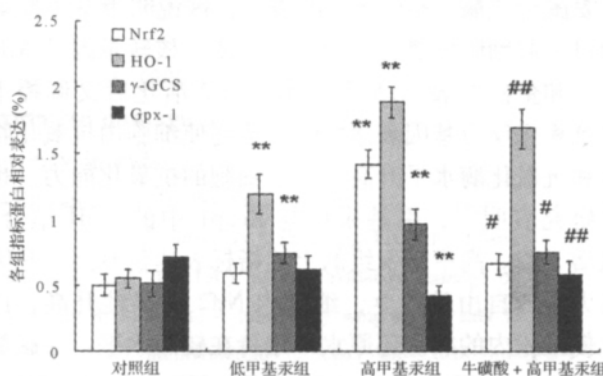
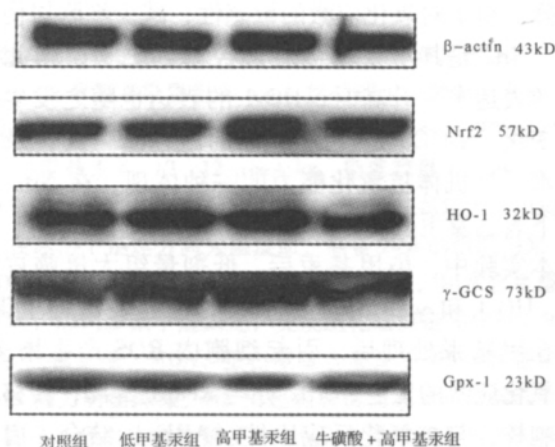
注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; 与高剂量甲基汞染毒组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠大脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 mRNA 表达 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

2.3 大鼠大脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 蛋白表达

各组大鼠大脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 蛋白表达见图 2。与对照组相比, 低甲基汞组 Nrf2 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$), 高甲基汞组表达见有明显升高 ($P < 0.01$); 低、高甲基汞组 HO-1 和 γ -GCS 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 仅高甲基汞组 Gpx-1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与高甲基汞

染毒组比较, 牛磺酸干预组 Nrf2、HO-1 和 γ -GCS 蛋白表达均下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 牛磺酸干预组 Gpx-1 的表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; 与高甲基汞染毒组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠大脑皮质 Nrf2、HO-1、 γ -GCS 和 Gpx-1 蛋白表达 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

MeHg 与—SH 有很高的亲和力, 其进入机体后主要与—SH 结合, 以半胱氨酸-甲基汞复合物 (Cys-MeHg) 的形式, 透过血脑屏障进入脑组织。本实验中, 与对照组比较, 低、高甲基汞组汞含量明显升高, 说明甲基汞在脑内聚集; 而牛磺酸干预后, 其含量并无明显差异, 提示牛磺酸并无驱汞作用。汞在脑组织中积累会产生 ROS, 自由基增多, 清除自由基的特异酶类如 SOD、GSH-Px 等活性会降低, 使机体清除自由基的能力下降, 最终导致机体的脂质过氧化损伤。

Nrf2 是外源性有毒物质和氧化应激的感受器, 在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的防御机制中发挥重要的作用^[7]。HO 是血红素降解的起始

酶及限速酶,能分解血红素,生成胆绿素、一氧化碳和游离铁,它在体内有不同基因编码的 HO-1、HO-2 和 HO-3 三种同工酶,其中 HO-1 的活性和蛋白表达最易被许多因素诱导,所以被称为诱导型 HO。HO-1 可以降低组织对氧化应激的敏感性,减少细胞损伤和凋亡,Nrf2 是其主要的上游调控基因之一,因此当 Nrf2 的表达水平升高时,HO-1 的表达也随之发生相应的变化。 γ -GCS 是合成 GSH 的限速酶,其转录和表达水平是机体抗氧化能力的一种体现,在 Nrf2 的调控下表达发生变化。

本实验中,染甲基汞后,低剂量组大鼠脑皮质 Nrf2、HO-1 和 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白表达均上调,推测在甲基汞处理后,引起细胞内 ROS 产生增多,导致氧化应激的发生;Nrf2 亦与 Keap1 解离,转移进入细胞核,与抗氧化反应原件 (AREs) 结合,启动 Nrf2 及其下游靶基因血红素加单氧酶 (HO-1) 和 γ -谷氨酰合成酶 (γ -GCS) 的表达,这说明甲基汞能够通过引起细胞内氧化应激反应,激活核转录因子 Nrf2 基因和蛋白的表达增强,同时 Nrf2 活化后又调控下游抗氧化反应基因表达增强,最终使细胞内抗氧化物质和抗氧化酶水平升高,增加细胞的抗氧化能力。也有研究表明^[8],甲基汞可与 Keap1 中的一SH 结合,激活 Nrf2。高甲基汞组的上述指标表达仍升高,是因为大量的自由基产生,细胞内 Nrf2 代偿性升高,以此使细胞内的氧化还原水平维持在较高水平。牛磺酸干预组与高甲基汞组比较 Nrf2、HO-1 和 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白的表达均明显下降,一方面是因为长时间的补充牛磺酸,加强了体内自由基防御体系的功能,削弱了自由基对细胞的损伤作用^[9];另一方面,牛磺酸具有抗氧化作用,能减少自由基,如对超氧阴离子自由基和羟自由基具有明显的清除作用。因此,干预组的自由基相对减少,细胞的应激性减弱,Nrf2 及其下游基因 HO-1、 γ -GCS 的表达下降。

实验中低甲基汞组 Gpx-1 的 mRNA 和蛋白较对照组表达受抑制,由于甲基汞对巯基有很高的亲和力,而 GSH 是一种非蛋白巯基化合物,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成,半胱氨酸上的巯基为其活性基团,是细胞内主要的抗氧化物质之一^[10]。甲基汞

与一SH 结合,使细胞内的半胱氨酸浓度降低,GSH 的合成相应减少,Gpx-1 的合成也随之减少。过量的自由基可能对 Gpx-1 的 mRNA 有一定的损伤作用,使其表达降低。牛磺酸对一SH 有保护作用^[11],牛磺酸干预后,自由基减少,Gpx-1 的 mRNA 和蛋白表达遂显著上调。

综上所述,此实验结果表明甲基汞激活 Nrf2 及其下游靶基因 HO-1 和 γ -GCS 并抑制抗氧化酶 Gpx-1 诱发氧化应激,而牛磺酸对其具有拮抗作用。

参考文献:

- [1] Ullrich S M, Trevor W, Abdrashitova S A. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation [J]. Crit Rev Environ Sci Technol, 2001, (31): 241-293.
- [2] Soderstorm S, Fredriksson A, Dencker L, et al. The effect of mercury vapour on cholinergic neurons in the fetal brain: studies on the expression of nerve growth factor and its low-and high-affinity receptors [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1995, 85: 96-108.
- [3] Ken Itoh, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain [J]. Genes Dev, 1999, 13: 76-86.
- [4] Sally S Alam, Nagla A Hafiz, Abeer H Abd El-Rahim. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxifen [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011, 31: 143-152.
- [5] Harris Ripps, Wen Shen. Taurine: A "very essential" amino acid [J]. Molecular Vision, 2012, 18: 2673-2686.
- [6] 赵达维. 冷原子吸收光谱法测定尿汞规范研究 [J]. 工业卫生与职业病, 1990, 16 (4): 237-238.
- [7] Wang Ling, Jiang Haiyan, Yin Zhaobao. Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes [J]. Toxicological Sciences, 2009, 107 (1): 135-143.
- [8] Takashi Toyama, Daigo Sumi. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 363: 645-650.
- [9] 张伟, 陈翠真, 董冰, 等. 牛磺酸对大鼠自由基的清除作用及其对亚硝酸钠性白内障脂质过氧化的影响 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38 (3): 157-160.
- [10] Townsend D M, Twe K D, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease [J]. Biomed Pharmacother, 2003, 57 (3-4): 145-155.
- [11] 李秋莲, 高秋华, 薛承斌, 等. 牛磺酸对染铅大鼠骨髓生化指标的影响 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21 (2): 189-190.

欢迎投稿、订阅、刊发广告