

文章编号:1004 - 616X(2001)03 - 0143 - 04

·论著·

胚胎早期低剂量甲基汞暴露对大鼠的行为致畸效应

刘 苹,吴锡南,纳冬荃,李 健,毛玉明,刘 毅

(昆明医学院预防医学系环境卫生学教研室,云南 昆明 650031)

摘要:目的:探讨胚胎早期甲基汞低剂量暴露对大鼠仔代的行为致畸效应。方法:Wistar 大鼠雌性 80 只、雄性 20 只以 3:1 交配,孕鼠随机分为 4 组,于妊娠 6~9 d 用氯化甲基汞 0.00 mg/(kg·bw·d)、0.01 mg/(kg·bw·d)、0.05 mg/(kg·bw·d)、2.00 mg/(kg·bw·d) 灌胃染毒。进行胚胎毒性研究;记录 201 只仔鼠出生后早期生理发育和神经行为发育指标;10 周龄的仔鼠 32 只进行操作行为测试;24 只进行脑组织形态学检查和单胺类神经递质(去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺)测定(荧光分光光度法)。结果:胚胎早期低剂量甲基汞对胎仔体重及尾长发育有抑制作用($P < 0.01$),暴露组仔鼠的体重增长、早期生理发育及神经行为发育滞后于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),操作行为成绩均比对照组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);3 个暴露组仔鼠均未观察到脑组织形态学改变,但单胺类神经递质含量均比对照组显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。所有结果呈现出剂量-反应关系。结论:胚胎早期低剂量甲基汞暴露有一定的胚胎毒性,可影响仔鼠神经系统的发育,导致行为改变。

关键词:行为致畸;仔代;甲基汞;大鼠

中图分类号:R994.6;R321.6;R055

文献标识码:A

NEUROBEHAVIORAL TERATOGENIC EFFECT ON RAT OFFSPRING AFTER EARLY PREGNANT EXPOSURE TO METHYLMERCURY AT LOW DOSE

LIU Ping, WU Xi-nan, NA Dong-quan, et al.

(Department of Environmental Health, Faculty of Public Health, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract: **Purpose:** To detect the neurobehavioral teratogenic effect of methylmercury exposure at early embryonic stage on offspring. **Methods:** Methylmercury chloride was force-fed to the Wistar rats during the 6th ~ 9th day after conception at doses of 0.00 mg/(kg·bw·d), 0.01 mg/(kg·bw·d), 0.05 mg/(kg·bw·d) and 2.00 mg/(kg·bw·d). The toxicity in the embryos, developmental landmarks of 201 offspring and operant behavior test of 32 offspring were measured. The brain morphology and the levels of monoamine neurotransmitters (NA, DA, 5-HT) were tested in 24 offspring at 10 weeks old. Double blind was used in whole experiment. **Results:** In 3 exposure groups, the body weight and tail development of embryos were slower ($P < 0.01$), the early developmental landmarks and neurobehavioral development of offspring were delayed ($P < 0.05$), and their performances in operant behavior were worse than those of the control group ($P < 0.05$). No histomorphological alteration in the offspring brains was observed in all groups. The levels of monoamine neurotransmitters in brains of 3 exposure groups were increased ($P < 0.05$). Some results showed a dose-effect relationship. **Conclusion:** Early pregnant exposure to methylmercury at a low dose showed some embryotoxicity and adverse effects on the developing nervous system of the rat offspring and also resulted in neurobehavioral changes.

Key words: methylmercury; behavioral teratogenicity; offspring; Wistar rat

收稿日期:2000-12-20;修订日期:2001-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39840003,39860068);云南省自然科学基金资助项目(96C070M)

作者简介:刘 苹(1954-),女,云南省石屏县人,教授,硕士,主要从事毒理学和环境医学研究。

行为作为感觉、运动、认知和记忆能力完整性的综合性终极表现,反映着神经系统各种功能的发育成熟和完善,它是神经系统综合了感觉、运动和认识等功能后的表现,代表机体对环境的综合反应^{1,2}。发育中的机体(包括胚胎和未成熟的个体)比生命的任何时期都更易受到环境中有害因素的影响。甲基汞可通过胎盘屏障,直接侵犯胎儿大脑,对中枢神经系统造成不可逆的损害,影响视觉、听觉功能,引起神经行为的改变,并对细胞遗传物质产生影响。国外对甲基汞的研究集中在它的致畸效应和神经毒性效应上³,而国内尚未见这方面的系统研究报道。本研究从胚胎毒性、仔鼠神经行为毒性和脑组织学效应等几个方面,对胚胎早期甲基汞暴露大鼠的行为致畸效应进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及暴露 健康3月龄Wistar大鼠(中国科学院昆明动物研究所提供,动物合格证号0000757),雌80只,雄20只,体重200~300g。雌雄以3:1于每晚6:00时合笼,次日晨进行阴道涂片检查,凡查出有精子者定为已交配,当日定为受孕“0”d。将孕鼠随机分为4组,于妊娠第6~9d采用氯化甲基汞溶液(methylmercury chloride MMC, CH₃HgCl,由德国Alfa公司提供,纯度:95%,批号:4310700。无水乙醇溶解,蒸馏水稀释配制而成)0.00 mg/(kg·bw·d),0.01 mg/(kg·bw·d),0.05 mg/(kg·bw·d),2.00 mg/(kg·bw·d)灌胃染毒。整个实验过程均根据随机化、双盲法原则进行。

1.2 胚胎毒性研究¹ 每组随机抽取6只孕鼠留待自然分娩,其余孕鼠于妊娠第19d时股动脉放血处死,剖腹取胎并记录活胎数、死胎数和吸收胎数;称量胎窝总重、胎盘总重;记录黄体数,逐一检查活产胎仔有无外观畸形,称量并记录每只胎仔体重、身长和尾长。然后按同窝同瓶的原则将1/2的胎仔放入盛有鲍音氏液的标本瓶中固定,进行内脏器官检查;另1/2剥去软组织后放入盛有茜素红染液的标本瓶中处理,进行骨骼检查。

1.3 早期神经行为发育研究 观察记录201只仔鼠(出生36d内)生理发育和神经行为发育指标:体重增长、张耳、门牙萌出、开眼、睾丸下降、阴道开启的时间;断崖回避、平面翻正、前肢悬挂、空中翻正、听觉惊愕、视觉定位。

1.4 操作行为测试 于4个实验组中各随机抽取8

只共32只仔鼠(雌雄各半)于10周龄时进行。在测定前对动物进行饮食限制,控制其体重增长在85%左右。测试时间为北京时间16:00-07:00时。采用电脑控制的操作行为测试仪,将大鼠置于行为测定箱中,先进行2d训练程序(DRO)的训练,然后进行2组6个难易不同的操作行为程序组合的程序测试:3个高频度差别强化率程序(Differential Reinforcement of High Rate, DRH)要求大鼠学习多次重复压杆;而3个低频度差别强化率程序(Differential Reinforcement of Low Rate, DRL)则要求其学会等待一段时间后再压杆。每晚15h的测试分为10个循环,每个循环以灯光为信号,分为交替进行的30min活动期(室灯亮)和60min非活动期(室灯熄灭)。所有测试都安排在活动期,此期若动物按程序要求正确压杆即可得到奖励性强化物(食丸);而在非活动期压杆则无食物奖励并被视为错误。电脑自动记录每只仔鼠在整个测定晚上的所有反应活动:活动期的压杆次数、非活动期的压杆次数、得到的食丸数,并计算学习成绩。

1.5 脑组织学研究 10周龄仔鼠每个实验组6只处死,快速取出新鲜完整的脑组织,称重,于大脑矢状中线切成两半,一半作脑组织单胺类神经递质检测:按照匡培根等⁴报道的荧光分光光度法测定去甲肾上腺素(NA)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT),标准品及生化试剂由Sigma公司提供,仪器为HITACHI-MPF-4型Fluorescence Spectrophotometer;另一半用10%甲醛固定,于大脑顶叶及小脑中部分作冠状面切片取材,酒精系列脱水、石蜡包埋、常规切片、HE及Marsland染色,光镜下观察。

1.6 统计学处理 实验数据采用SPSS 8.0统计软件包,根据资料分布情况,分别采用方差分析、*t*检验、²检验、秩和检验、等级相关分析等统计学方法进行处理。

2 结果

2.1 胚胎毒性 孕鼠剖腹取胎检查,各组均无死胎和吸收胎。3个暴露组孕鼠的产仔数(窝大小)、黄体数、胎窝总重、胎盘总重与对照组相比均无显著性差异(方差分析, $P > 0.05$)。3个暴露组胎仔体重和尾长均明显低于对照组(见表1),差异有高度显著性(秩和检验, $P < 0.01$)。除高暴露组有1只胎仔第四脑室膨大(3 mm × 2 mm)外,4个实验组胎仔的外观和内脏器官均未见异常;3个暴露组胎仔的骨化程度与对照组亦无差异(方差分析, $P > 0.05$)。

表1. 甲基汞对胎仔体重、身长、尾长的影响

Table 1. Developmental landmarks of embryos after pregnant exposure to MMC (M ± Q)

| Dose mg/ (kg ·bw ·d) | n | Body weight (g) | Body length (cm) | Tail length (cm) |
|-------------------------|----|--------------------|---------------------|---------------------|
| 0.00 | 68 | 2.60 ±0.52 | 4.60 ±0.30 | 1.30 ±0.15 |
| 0.01 | 65 | 2.50 ±0.34 ** | 4.50 ±0.30 | 1.20 ±0.10 ** |
| 0.05 | 54 | 2.50 ±0.59 ** | 4.50 ±0.55 | 1.25 ±0.19 ** |
| 2.00 | 80 | 2.40 ±0.34 ** | 4.40 ±0.30 | 1.20 ±0.15 ** |

** P < 0.01; M: medium; Q: Quartile, comparison with control group

2.2 早期生理和神经行为发育指标 高暴露组体重增长明显低于对照组(方差分析, P < 0.01);除仔鼠耳率率低暴露组与对照组比较显著升高(χ²检验, P < 0.05);睾丸下降率高暴露组与对照组比较显著降低(χ²检验, P < 0.05)外,其余生理指标未见异常。神经行为发育测试结果:表2显示仔鼠前肢悬挂时间高暴露组比其他3组均显著缩短(秩和检验, < 0.05);表3显示仔鼠听觉惊愕级别高、中暴露组均比对照组显著升高(秩和检验, P < 0.01)。

表2. 甲基汞暴露对仔鼠前肢悬挂时间的影响

Table 2. Time of forelimb hanging of offspring after embryonic exposure to MMC

| Dose mg/ (kg ·bw ·d) | n | Time of forelimb hanging (s) | | | | |
|-------------------------|-----|------------------------------|----|-----|-----|-----|
| | | 0~ | 5~ | 10~ | 15~ | 20~ |
| 0.00 | 46 | 1 | 8 | 15 | 11 | 11 |
| 0.01 | 50 | 0 | 11 | 8 | 11 | 20 |
| 0.05 | 43 | 3 | 7 | 8 | 6 | 19 |
| 2.00 | 66* | 15 | 19 | 9 | 9 | 14 |

* P < 0.05, comparison with control group

表3. 甲基汞暴露对仔鼠听觉惊愕的影响

Table 3. Levels of auditory startle of offspring after embryonic exposure to MMC

| Dose mg/ (kg ·bw ·d) | n | Level of auditory startle | | | |
|-------------------------|------|---------------------------|----|----|-----|
| | | - | + | ++ | +++ |
| 0.00 | 44 | 6 | 33 | 5 | 0 |
| 0.01 | 50 | 14 | 32 | 4 | 0 |
| 0.05 | 41** | 3 | 18 | 13 | 7 |
| 2.00 | 66** | 5 | 37 | 21 | 3 |

* P < 0.01, comparison with control group

2.3 操作行为测试 2组仔鼠不同频度差别强化率程序的学习成绩无性别差异(方差分析, P > 0.05),故将雌雄大鼠的学习成绩合并计算。表4显示胚胎期甲基汞暴露大鼠的DRH程序和DRL程序的成绩:

与对照组相比,3个暴露组的成绩均下降(方差分析,两两比较用LSD法, P < 0.05);剂量与学习成绩关系的等级相关分析在DRH程序有高度显著性(r_s = -0.7273, P < 0.01),在DRL程序则无显著性(r_s = -0.2238, P > 0.05)。

表4. 大鼠在不同程序的操作行为成绩比较(̄x ± s)

Table 4. Operant performances of offspring in different programs

| Dose mg/ (kg ·bw ·d) | n | DRH (%) | DRL (%) |
|-------------------------|---|-----------------|----------------|
| 0.00 | 8 | 59.53 ±13.37 | 29.78 ±13.38 |
| 0.01 | 8 | 44.16 ±10.97* | 22.19 ±7.29** |
| 0.05 | 8 | 47.78 ±12.98* | 24.34 ±12.95* |
| 2.00 | 8 | 33.91 ±29.58*** | 22.32 ±12.50** |

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, comparison with control group

2.4 脑组织学效应 3个暴露组仔鼠的脑重及脑组织形态学与对照组相比差异均无显著性(P > 0.05)。图1结果显示:仔鼠脑组织单胺类神经递质去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺的含量均比对照组明显增高(方差分析, P < 0.05),且均呈现剂量-反应关系(等级相关分析:相关系数 r_s 分别为 0.8896、0.7720、0.9117, P 均 < 0.01)。

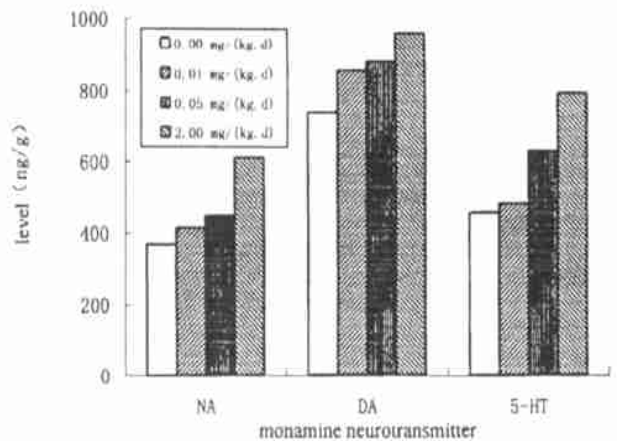


图1. 胚胎早期甲基汞暴露大鼠脑组织中单胺类神经递质的含量
Figure 1. Levels of monamine neurotransmitter in offspring brains after embryonic exposure to MMC

NA: norepinephrine; DA: dopamine; 5-HT: 5-hydroxytryptamine

3 讨论

行为畸胎学主要研究出生前暴露于各种有害因素所导致的仔代出生后神经行为功能异常和障碍。

行为致畸效应可在低于引起结构畸形的剂量下就出现,表现为损伤认识、感情、唤醒、生殖、感觉运动等行为,使这些能力的成熟迟滞,或导致行为指标的改变⁵。甲基汞的毒性效应几乎覆盖了神经行为毒理学的所有领域,而且对灵长类和啮齿类动物的研究结果有很大的相似性⁶。人群资料显示低剂量甲基汞暴露引起的胚胎毒性常伴随着轻微的或可逆的母体毒性,而动物实验表明在未观察到母体毒性时就可发生胚胎毒性。研究发现在小鼠妊娠期用3~30 mg/(kg bw·d)甲基汞灌胃,孕鼠体重明显减轻;出现死胎和吸收胎、胚胎畸形,以及仔鼠腭裂和体重减轻^{7,8}。本研究剂量的3个甲基汞暴露组胎仔的外观和内脏器官均未发现畸形,但胎仔体重减轻、尾长缩短,提示低剂量甲基汞对大鼠有一定的胚胎毒性。

较高水平的甲基汞暴露可引起视觉和运动功能失调,胚胎期甲基汞暴露可影响耳蜗神经末梢和毛细血管,诱发听力损伤^{8,9}。本实验发现:胚胎早期甲基汞暴露仔鼠体重增长低于对照组;暴露组张耳率升高,睾丸下降率降低;前肢悬挂时间缩短,听觉惊愕程度升高。这表明在本实验剂量下,胚胎早期甲基汞暴露可影响仔鼠的早期生理发育指标,损伤抓握力与听力,结果与前述结论相似^{8,9}。

大量研究表明,动物妊娠期暴露于甲基汞后,其仔代可产生明显的行为改变,包括神经反射发育、游泳能力、自发活动、旷场实验、迷宫学习、回避反应、程序控制行为、睡眠-觉醒节律等^{10,11}。由于中枢神经系统的复杂性和功能的多样性,行为功能易受其他因素的影响,只有严格控制影响因素才能取得有意义的结果。操作行为测试用于检测动物学习和记忆的综合能力,它提供了类似对人类研究对象教学自由回忆测定的方法,对于分析实验动物的学习和记忆能力是有力的工具¹²,该实验的对象多选用大鼠和小鼠,也有采用猕猴和鸽子的报道¹³。同前述研究一致^{10,11},本研究在低暴露组就观察到仔鼠操作行为测试中出现明显的学习记忆障碍:无论是DRH或DRL的成绩,各暴露组均比对照组降低。本研究采用的电脑控制的操作行为测试是研究外来化合物对中枢神经毒作用阈值的有效测试手段,该方法不仅避免了外环境如实验观察者等的影响,使其结果更敏感、可靠和具有客观性;而且可将多种程序结合起来测定,并进行定量,从而更容易发现毒物对中枢神经系统的早期损害。这种采用整体动物,而且不造成动物任何损伤的实验方法,为研究毒物对中枢神经毒性

作用阈值的测定提供了客观、敏感、安全、定量的测试手段。

学习记忆的过程是中枢神经系统神经元之间各种复杂信息的传递过程,神经递质在神经元间信息传递过程中起着重要作用。由于甲基汞对单胺氧化酶的抑制作用远远大于对色氨酸羟化酶活性的抑制作用,最终表现为单胺类神经递质含量的增加。此外甲基汞对突触前膜神经递质的释放和摄取,以及突触后膜受体结合部位都能够产生影响,从而扰乱单胺类神经递质的正常功能¹⁴。与许多研究结果相似¹⁵,本实验结果发现3个甲基汞暴露组仔鼠的脑组织虽未见形态学的改变,但脑内NA、DA、5-HT含量均比对照组显著增高,并呈现出剂量-反应关系,这表明低剂量甲基汞可通过胎盘屏障、血脑屏障以及乳汁从亲代传到仔代,对大鼠脑组织产生影响:在未引起明显组织形态学改变的剂量下,单胺类神经递质的含量就可发生紊乱。说明甲基汞暴露在引起形态损伤之前,组织化学的改变就已经出现。

本研究剂量的甲基汞胚胎早期暴露不引起仔代大鼠形态畸形,但可使胎仔的生理发育滞后;影响大鼠的神经行为发育,导致学习记忆能力的降低;并使脑组织单胺类神经递质含量增高,表明甲基汞暴露在未引起器官和形态损伤的剂量下,神经行为学和神经组织化学的改变就已经出现。

(致谢:本课题得到德国Bornhausen博士、昆明医学院刘汉钧教授、田兴亚教授、王国英教授和黄翠轩教授的鼎力支持与帮助,特此致谢。)

参考文献:

- 1 张 锐,刘毓谷. 毒理学M. 第1版. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997. 348~377,402~422.
- 2 Tilson HA, Mitchell CL. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemical on the nervous systemJ. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1984, 24: 425~450.
- 3 Weiss B. Long ago and far away: a retrospective on the implications of MinamataJ. *Neurotoxicology*, 1996, 17(1): 257~263.
- 4 匡培根,周新富,徐 波. 脑组织中单胺类神经递质的提取和荧光分光光度测定法J. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1982, 3(2): 315~319.
- 5 Acuff-Smith KD, Vorhees CV. Neurobehavioral teratology A. Niesink RJM, Jaspers RMA, Kornet LMW, et al. Introduction to neurobehavioral toxicology: food and environment M. Boca, Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 1999. 26~69.
- 6 Watanabe C, Satoh H. Evolution of our understanding of methylmercury as a health threatJ. *Environ Health Perspect*.

文章编号:1004 - 616X(2001)03 - 0147 - 04

· 论著 ·

珍香胶囊对人食管癌的抗癌作用及其机制研究

许锦阶¹,徐小虎¹,王德昌²,曾宪明³

(1. 汕头大学医学院病理学和病理生理学系,广东 汕头 515031; 2. 中国医学科学院肿瘤医院药理室,北京 100073; 3. 中山医科大学实验动物中心,广东 广州 510089)

摘要:目的:探讨珍香胶囊对人食管癌的抗癌作用及其机制。方法:应用光镜、透射电镜和流式细胞仪,观察珍香胶囊诱导体外培养的人食管癌细胞株 EC109 细胞凋亡的作用;应用人食管癌裸鼠移植瘤模型,观察珍香胶囊的抗癌作用。结果:在体外,经珍香胶囊处理的 EC109 细胞出现典型的细胞凋亡特征。在体内,珍香胶囊 3 个剂量 4 800 mg/(kg·bw)、2 400 mg/(kg·bw)、1 200 mg/(kg·bw) 对裸鼠移植的人食管癌的抑瘤率分别为 70.80%~75.00% ($P < 0.01$)、58.33%~64.71% ($P < 0.01$)、37.04%~45.10% ($P < 0.01$),阳性对照平阳霉素(15 mg/(kg·bw))对裸鼠移植的人食管癌的抑瘤率为 51.33%~60.78% ($P < 0.01$)。结论:珍香胶囊在体外有诱导人食管癌细胞产生凋亡的作用,这可能是珍香胶囊抗食管癌作用的重要机制。在裸鼠可耐受的剂量下,珍香胶囊对裸鼠移植的人食管癌有明显抗癌作用,且随着剂量增加,其抗癌疗效增加。

关键词:珍香胶囊;食管癌;动物疾病模型;裸鼠

中图分类号:R735.1

文献标识码:A

ANTITUMOR EFFECT AND MECHANISMS OF ZHENXIANG CAPSULE ON HUMAN ESOPHAGEAL CARCINOMA

XU Jin-jie¹, XU Xiao-hu¹, WANG De-chang², ZENG Xian-ming³

(1. Department of Pathology and Pathophysiology Shantou University Medical College, Shantou 515031, China; 2. Department of Pharmacology, Institute Oncology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100073, China; 3. Department of Experiment Animal Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510087, China)

收稿日期:2000-09-19;修订日期:2000-12-26

基金项目:本课题为国家科技型中小企业技术创新基金资助项目(99C26114400049)和广东省中医药管理局科研基金资助项目(98416)

作者简介:许锦阶(1967-),男,广东潮阳市人,实验师,从事肿瘤实验性治疗研究。

- 1996, 104 Suppl 2: 367~379.
- 7 Ornaghi F, Ferrini S, Prati M, *et al.* The protective effects of N-acetylcysteine against methyl mercury embryotoxicity in mice J. *Fundam Appl Toxicol*, 1993, 20(4): 437~445.
- 8 Curle DC, Ray M, Persaud TV. *In vivo* evaluation of teratogenesis and cytogenetic changes following methylmercuric chloride treatment J. *Anat Res*, 1987, 219(3): 286~295.
- 9 Winneke G, Lilienthal H. Metals. Niesink RJM, Jaspers ANA, Körtner LMW, *et al.* Introduction to neurobehavioral toxicology food and environment M. Boca, Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 1999. 345~381.
- 10 Shimai S, Satoh H. Behavioral teratology of methylmercury J. *J Toxicol Sci*, 1985, 10(3): 199~216.
- 11 Stoltenburg DG, Markwort S. Prenatal methylmercury exposure results in dendritic spine dysgenesis in rats J. *Neurotoxicol Teratol*, 1990, 12(6): 573~576.
- 12 Kulig BM, Jaspers RMA. Assessment techniques for detecting neurobehavioral toxicity. Niesink RJM, Jaspers RMA, Komet LMW, *et al.* Introduction to neurobehavioral toxicology: food and environment M. Boca, Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 1999. 71~113.
- 13 Rhee DC. Effects of pre-plus postnatal exposure to methylmercury in the monkey on fixed interval and discrimination reversal performance J. *Neurotoxicology*, 1992, 13(2): 443~452.
- 14 Slotkin TA, Bartolome J. Biochemical mechanisms of developmental neurotoxicity of methylmercury J. *Neurotoxicology*, 1987, 8(1): 65~84.
- 15 O'Kusky JR, Boyes BE, McGeer EG. Methylmercury-induced movement and postural disorders in developing rat: regional analysis of brain catecholamines and indoleamines J. *Brain Res*, 1988, 439 (1-2): 138~146.