

环境无机汞对泥鳅视网膜 S100 表达影响

万 安 孙庆艳 华田苗* 张大银 王赦焱 童传旺

(安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000)

摘要: 用含低浓度 Hg^{2+} 的水饲养泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*), 研究 Hg^{2+} 污染对视网膜中 S100 免疫反应阳性结构数量及分布的影响。用免疫组织化学 ABC 法标记 S100 免疫阳性 (S100-IR) 细胞, 显微镜下观察 S100 免疫反应阳性细胞并计数。结果显示, 处理组 S100 首先在神经节细胞层 (GCL) 神经纤维层 (NFL) 表达, 然后逐渐在其他各层表达。与对照组相比, 处理组 S100 免疫反应阳性细胞数显著增多, 且该变化与环境中无机汞处理时间成正相关; 阳性细胞胞体明显膨胀, 突起稠密粗大, S100 阳性反应强。研究提示, Hg^{2+} 的神经毒害作用导致泥鳅视网膜中 S100-IR 细胞数的增多。推测 Hg^{2+} 污染可能对视网膜有伤害性影响, 而神经胶质细胞在视网膜修复过程中起了重要作用。

关键词: 泥鳅; 无机汞; 视网膜; S100 蛋白; 神经毒害

中图分类号: Q954.67+3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2007)01-48-06

Exposure to Inorganic Mercury Affects S100-expression in the Retina of Loaches

WAN An SUN Qing-Yan HUA Tian-Miao* ZHANG Da-Yin WANG She-Yan TONG Chuan-Wang

(School of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract Exposing loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*) to water with low concentration of Hg^{2+} for several weeks, we studied the effect of Hg^{2+} pollution on the distribution and number of S100-IR structure in the retina. Immunohistochemical ABC method was applied to display the S100 immunoreactive (S100-IR) structure. Under microscope we observed and counted the numbers of S100-IR cells. The S100-IR cells appeared in the nerve fibre layer (NFL), ganglion cell layer (GCL), and then progressively in the other layers. Compared with the control fish, the number of S100-IR cells in poisoned loaches increased significantly and was proportional to exposure time. In addition, the S100 immunoreactive cells showed a swollen cell body with enhanced S100-immunoreactivity. In conclusion, Hg^{2+} appears to damage retina and glial cells may play an anti-toxic role in retina recovering in loaches.

Key words Loach; Inorganic mercury; Retina; S100 protein; Neurotoxicity

S100 是一类由神经胶质细胞分泌的酸性钙结合蛋白, 可作为神经胶质细胞标记蛋白。S100 蛋白与神经系统的生理功能关系密切, 其含量的变化常用来作为检测神经系统生理功能的一项指标^[1,2]。研究发现重金属中毒后, 哺乳动物神经系统中 S100 表达旺盛^[3,4], 但重金属对水生脊椎动物神经系统 S100 蛋白表达水平的影响罕有研究。

硬骨鱼类视网膜具有终生再生、受损后修

复能力强的特性, 是研究视网膜损伤修复过程的理想材料^[5~7]。研究发现神经胶质细胞参与

基金项目 安徽省教育厅科研基金 (No. 2003kj152, No. 2004kj177), 安徽师范大学青年基金 (No. 2004xqn09) 和安徽师范大学博士启动经费;

* 通讯作者, E-mail: htiotxh@langate.gsu.edu;

第一作者介绍 万安, 男, 硕士研究生; 研究方向: 神经生物学; E-mail: wananahnu@126.com;

收稿日期 2006-08-14, 修回日期 2006-11-06

了视网膜神经细胞的营养、神经轴突正确迁移等过程^[8~10]。本研究以低浓度无机汞中毒后的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)为材料,用免疫组织化学 ABC 法标记视网膜中 S100 免疫阳性(S100-IR)细胞,观察并计数中毒后 S100 免疫反应阳性结构分布及其变化。为深入探讨神经胶质细胞在鱼类视网膜再生修复功能中的作用,以及环境中重金属对硬骨鱼类神经系统的毒害及其毒理机制,更有效地治理水环境中重金属的污染,提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用泥鳅采自安徽省芜湖市郊农田。选取个体均匀,体重为 18~22 g,体长约为 15~20 cm。在室内静养 48 h 后,挑选健康活泼、体表无损的个体为实验鱼。鱼食为干制鱼虫。实验用无机汞为分析纯氯化汞(HgCl_2),系上海试剂四厂生产,实验前用蒸馏水配成 5.0 mg/L 和 2.0 mg/L 的母液,然后采用母液稀释的方法配制成实验所需浓度。

1.1.1 急性中毒预实验及亚慢性中毒实验 急性实验,将氯化汞设置 6 个浓度梯度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg/L),另设一个空白对照组(不加氯化汞),每组两个重复。实验在 10 L 鱼缸中进行,每缸盛 7.5 L 曝气除氯的自来水,放入受试鱼 15 尾,实验期不投饵。随时记录泥鳅中毒症状,拣出死亡个体。至 96 h 计算每缸中泥鳅的死亡数,并求出 96 h 半致死浓度(LC_{50})值。

急性中毒实验中获得氯化汞对泥鳅 96 h LC_{50} 为 2.05 mg/L,设其 1/10(0.2 mg/L)为暴露浓度,进行亚慢性中毒实验。实验鱼共 120 尾,分别在 6 个缸内培养,其中一缸设为空白对照组(不加氯化汞),另 5 缸为处理组,每缸 20 尾。实验期间,每 2 d 更换一半处理液,少量投喂鱼食(0.3 g/缸)。随时拣出死亡个体。

1.1.2 取材 亚慢性中毒实验中每隔 3 d 在处理组中取出 4 条,空白对照组中取 1 条。4℃水中麻醉,迅速断头,取下眼球置于 Bouin 氏液中整体固定,PBS 冲洗,常规脱水、透明、石蜡包

埋,连续切片厚 6 μm ,裱片于经 APES 处理的载玻片上,备免疫组织化学染色。

1.2 免疫组织化学染色 每只眼球材料选取中央区附近,每隔 5 张切片取 1 张用于免疫组织化学染色:切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育 5 min,以消除内源性过氧化物酶活性;蒸馏水冲洗,0.03% Triton X100-PBS 浸泡 5 min,增加细胞膜通透性;蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;滴加 5% 小牛血清(BSA),室温孵育 10 min,封闭非特异性反应部位;倾去血清,勿洗,滴加一抗(兔抗牛 S100 抗体 1:200),37℃孵育 1 h;PBS 冲洗 5 min 3 次;滴加生物素标记二抗(羊抗兔 IgG 抗血清),37℃孵育 10 min;PBS 冲洗 5 min 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记三抗(链酶卵白素,ABC),37℃孵育 10 min;PBS 冲洗 5 min 3 次;DAB 显色,自来水冲洗、苏木素复染、脱水、透明、封片。阴性对照实验用小牛血清代替一抗,其余步骤同上。实验所用 S100 的兔抗牛血清及免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 购于 Zymed 公司。

1.3 观察和统计分析 染色后的切片在 Olympus BX51 型显微镜下观察拍照。对 S100 显色的切片,每张切片在光镜($\times 400$)下随机选取 8 个视野,使采集网格(125 $\mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$)的两平行边与视网膜的表面垂直,计数采集网格内神经节细胞层(GCL)、神经纤维层(NFL)的 S100-IR 细胞数目,换算成线密度(细胞数/mm),并计算平均值。所有数据采用平均值 \pm 标准误表示,用 SPSS 软件单因素方差分析各组间差异显著性。因对照组的 S100-IR 细胞反应平淡,数目极少,故未进行统计分析。

2 结果

在亚慢性汞中毒实验中,泥鳅最长存活 23 d。免疫组织化学染色结果发现,处理组和对照组的视网膜 GCL 和 NFL 均有 S100-IR 细胞存在。在空白对照组的视网膜中,S100-IR 细胞阳性反应较弱(图版 I:1)。阴性对照实验组未见阳性反应(图版 I:2)。处理组视网膜 S100-IR 结构显著多于空白对照组,S100-IR 细胞阳性反

应强(图版 I 3 5, 7):遍布胞浆及突起的棕黄色免疫染色,胞体明显膨胀,突起稠密粗大,相邻的细胞突起相互交织成网状,S100-IR 细胞大都呈星形,少数呈椭圆。随暴露时间延长,神经节细胞层、神经纤维层 S100-IR 细胞密度增加,开始增加较慢,其后增加速度逐渐加快(图 1),另外随暴露时间延长,内网状层、内核层、外网状层、外核层出现棕黄色阳性纤维,杆锥层开始出现棕黄色阳性结构(图版 I 4 6 8)。

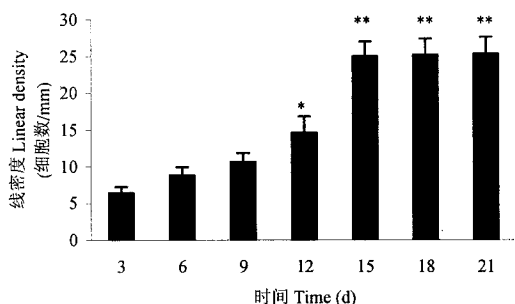


图 1 亚慢性无机汞中毒后泥鳅视网膜 GCL 和 NFL 层 S100-IR 细胞密度变化

Fig. 1 The density changes of S100-IR cells in GCL and NFL of the retinae after subchronical exposure of loaches to inorganic mercury

经单因素方差分析,与起始点(3 d)相比,12 d GCL 和 NFL 层 S100-IR 细胞密度呈现显著差异(* $P < 0.05$),15 d 起出现极显著差异(** $P < 0.01$)。

Compared to the primary (3 days) group, the 12-day group showed significant difference (* $P < 0.05$) and the 15-day group showed highly significant difference (** $P < 0.01$) as revealed by a single factor ANOVA.

3 讨论

Selye 将胁迫条件下鱼体的生理状态曲线分为警告期(alarm phase)、抵抗期(resistance phase)和疲惫期(exhaustion phase)3 个反应期。警告期中,鱼体各器官产生特异性反应,在抵抗期里,鱼体内生理状态出现紊乱,体内各调节机制发生作用,努力使鱼体保持在协调状态,疲惫期的鱼类体内调节失控,最终打破机体平衡,出现死亡^[11,12]。本实验中泥鳅亚慢性汞中毒 9 ~ 12 d 后,处理组视网膜中胶质细胞反应开始加

剧,15 d 后达到平衡。23 d 后,处理组泥鳅全部死亡(图 1)。符合 Selye 提出的胁迫条件下鱼体的生理状态曲线。本实验结果提示在胁迫初期,鱼体内 S100 分泌功能随外界环境变化发生相应改变,使机体在胁迫环境中能维持神经元正常功能。由于个体的差异,15 d 后部分鱼类能够通过自身的调节最终适应环境的变化, S100 分泌再次达到动态平衡,保持机体内环境的稳态。但随胁迫持续时间的延长,鱼体自身调节和免疫保护的压力过大,生理状态出现紊乱。最终由于耗能过多,胁迫对鱼体的刺激超过机体本身可调控的阈值,23 d 后,全部泥鳅因衰竭而死亡。

Hg^{2+} 可以导致神经元的膜功能受损,破坏 Ca^{2+} 的稳定机制,导致细胞内 Ca^{2+} 增加。神经细胞内生理钙浓度是维持其正常生理功能所必需的,但 Ca^{2+} 浓度过高会损伤神经元,触发一系列病理过程,导致神经元死亡。另外 Hg^{2+} 易进入胶质细胞内,同时无机汞能在水体微生物以及在鱼体内转化成有机汞(MMC)形式,两者进入胶质细胞使其肿胀并抑制兴奋性氨基酸的摄取,使细胞外液兴奋性氨基酸异常升高,过度刺激邻近神经元表面兴奋性氨基酸受体,从而激发毁灭性级联反应损害神经元,加剧 Hg^{2+} 对水生脊椎动物神经系统的毒害^[13~20]。

S100 是一类高度保守的神经胶质钙结合蛋白,广泛分布在脊椎动物的中枢神经系统、上皮组织等处^[21~23]。S100 蛋白亦存在于硬骨鱼类(丁鲷 *Tinca tinca* 等)正常视网膜的 NFL 层^[9,10,15]。S100 蛋白能参与神经胶质细胞内 Ca^{2+} 的贮存和转运^[2],并维持细胞外谷氨酸水平,保护神经元免受谷氨酸兴奋毒性和自由基等引起的损害,提供神经元所需能量^[2,19,24,25]。观察结果显示,处理组视网膜 S100-IR 细胞数目增多、胞体膨胀、突起较多,推测亚慢性 Hg^{2+} 中毒致使泥鳅视网膜胶质细胞中 S100 蛋白表达增强,其结合 Ca^{2+} 增多,使神经元内 Ca^{2+} 减少,减弱由于 Ca^{2+} 超载而造成的对神经元毒害作用,同时维持神经元周围谷氨酸水平,降低谷氨酸兴奋毒性作用,对保护神经元、维护视网膜

正常功能有重要意义。

此外,我们观察到随暴露在汞污染水中时间的延长,除神经节细胞层、神经纤维层外,泥鳅视网膜的外网状层、外核层、内网状层、内核层、杆锥层中阳性反应也在逐渐增强,其中的生理原因有待进一步研究。

致谢 承蒙安庆师范学院化学材料和资源环境学院孙慧群老师对染毒实验部分的指导,安徽师范大学生命科学院严密、杨红飞、姚婧和张兴旺同学在实验过程中的支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 苏亮.S100 蛋白与脑损伤.广西医科大学学报,2004,21(3):462~463.
- [2] Zimmer D B, Cornwall E H, Landar A, et al. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, 1995, 37: 417~429.
- [3] Huang J, Tanii H, Kato K, et al. Neuron and glial cell marker proteins as indicators of heavy metal-induced neurotoxicity in neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Toxicol*, 1993, 67(7):491~496.
- [4] Vicente E, Boer M, Leite M, et al. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neuro Toxicology*, 2004, 25(5):771~777.
- [5] Mc Quarrie I G, Grafstein B. Protein synthesis and axonal transport in goldfish retinal ganglion cell during regeneration accelerated by a conditioning lesion. *Brain Res*, 1982, 251(1):25~37.
- [6] Raymond P A, Hitchcock P F. How the neural retina regenerates. *Results Probl Cell Differ*, 2000, 31:197~218.
- [7] Ghali R P, Herx L M, Maa A, et al. Mononuclear cell proliferation and hyperplasia during Wallerian degeneration in the visual system of the goldfish in the presence or absence of regenerating optic axons. *Brain Res*, 2000, 854(1-2):178~188.
- [8] Dowding A J, Maggs A, Scholes J, et al. Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL-1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia*, 1991, 4(4):345~364.
- [9] Velasco A, Caminos E, Vecino E, et al. Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., Teleost): a study with tomato lectin. *Brain Res*, 1995, 705(1-2):315~324.
- [10] Velasco A, Brinon J G, Caminos E, et al. S100-positive glial cells are involved in the regeneration of the visual pathway of teleosts. *Brain Res Bull*, 1997, 43(3):327~336.
- [11] Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*, 1950(4667):1383~1392.
- [12] Selye H. The evolution of the stress concept. *Am Sci*, 1973, 61(6):692~699.
- [13] 杨若明.环境中有毒有害化学物质的污染与监测.北京:中央民族大学出版社,2001:72~76.
- [14] 龚宇虹,李健学.无机汞对大鼠脑单胺类神经递质代谢的影响.卫生毒理学杂志,1994,8(3):55~158.
- [15] Allen J W, El-Oqayli H, Aschner M, et al. Methylmercury has a selective effect on mitochondria in cultured astrocytes in the presence of [U-(13C)] glutamate. *Brain Res*, 2001, 908(2):149~154.
- [16] Aschner M, Mullaney K J, Wagoner D E Jr, et al. Adenosine modulates methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced D-aspartate release from neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Res*, 1995, 689(1):1~8.
- [17] Saijoh K, Inoue Y, Smino K. Effects of methylmercury chloride and mercury chloride (II) on release and uptake of ³H-dopamine in guinea pig striatal slices. *Nippon Eiseigaku Assh*, 1987, 42(4):887~893.
- [18] Rajanna B, Hobson M. Influence of mercury on uptake of [³H] dopamine and [³H] norepinephrine by rat synaptosomes. *Toxicol Lett*, 1985, 27(1-3):7~14.
- [19] Aschner M, Yao C P, Allen J W, et al. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int*, 2000, 37(2-3):199~206.
- [20] 关海红,蔺玉华,刘伟.汞在松浦鲤体内的转化及对鳃组织的损伤.大连水产学院学报,2004,19(1):58~61.
- [21] Abbate F, Catania S, Germana A, et al. S-100 protein is a selective marker for sensory hair cells of the lateral line system in teleosts. *Neurosci Lett*, 2002, 329(2):133~136.
- [22] Germana A, Montalbano G, Laura R, et al. S100 protein-like immunoreactivity in the crypt olfactory neurons of the adult zebrafish. *Neurosci Lett*, 2004, 371(2-3):196~198.
- [23] Vecino E, Velasco A, Caminos E, et al. Distribution of S100 immunoreactivity in the retina and optic nerve head of the teleost *Tinca tinca* L. *Microsc Res Tech*, 1997, 36(1):17~25.
- [24] Lillo C, Velasco A, Jimeno D, et al. The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *Histochem Cytochem*, 2002, 50(10):1289~1302.
- [25] 梅忠喜,程欣,郑达人.S100 蛋白在大鼠缺血视网膜的分布和变化.中国组织化学与细胞化学杂志,2000,9(1):25~29.

图版说明

处理组与对照组 S100 免疫反应阳性细胞。

1. 空白对照组视网膜 ×400 ;2. 阴性对照组(处理组 12 d 苏木素复染) 无阳性反应 ×400 ;3. 处理组 6 d 视网膜 NFL ,GCL ×1 000 ;4. 处理组 6 d 视网膜 S100-IR 结构。RCL 出现阳性反应 ×400 ;5. 处理组 12 d 视网膜的 NFL ,GCL ×1 000 ;6. 处理组 12 d 视网膜 S100-IR 结构 ×400 ;7. 处理组 18 d 视网膜 NFL ,GCL。IPL 出现阳性纤维 ×1 000 ;8. 处理组 18 d 视网膜 S100-IR 结构。IPL、INL、OPL、ONL 出现阳性纤维。杆锥层出现大量阳性反应 ×400。

RCL 杆锥层 ;ONL 外核层 ;OPL 外网状层 ;INL 内核层 ;IPL 内网状层 ;GCL 神经节细胞层 ;NFL 神经纤维层 ;↑ S100-IR 细胞。

Explanation of Plate

1 – 8. S100-IR cells of the retinae in poisoned and nonpoisoned loaches.

1. The retinae in control group ×400 ;2. The negative experiment (poisoned group after 12 days ,restained by hematoxylin) ,nonpositive reaction ×400 ;3. The NFL ,GCL of the retinae in poisoned group after 6 days ×1 000 ;4. The S100-IR structure of the retinae in poisoned group after 6 days showed the positive reaction in RCL ×400 ;5. The NFL ,GCL of the retinae in poisoned group after 12 days ×1 000 ;6. The S100-IR structure of the retinae in poisoned group after 12 days ×400 ;7. The NFL ,GCL of the retinae in poisoned group after 18 days ,showed the immunoreactive filaments in IPL ×1 000 ;8. The S100-IR structure of the retinae in poisoned group after 18 days ,showed the immunoreactive filaments in IPL ,INL ,OPL ,ONL ; And the significant positive reaction in RCL ×400.

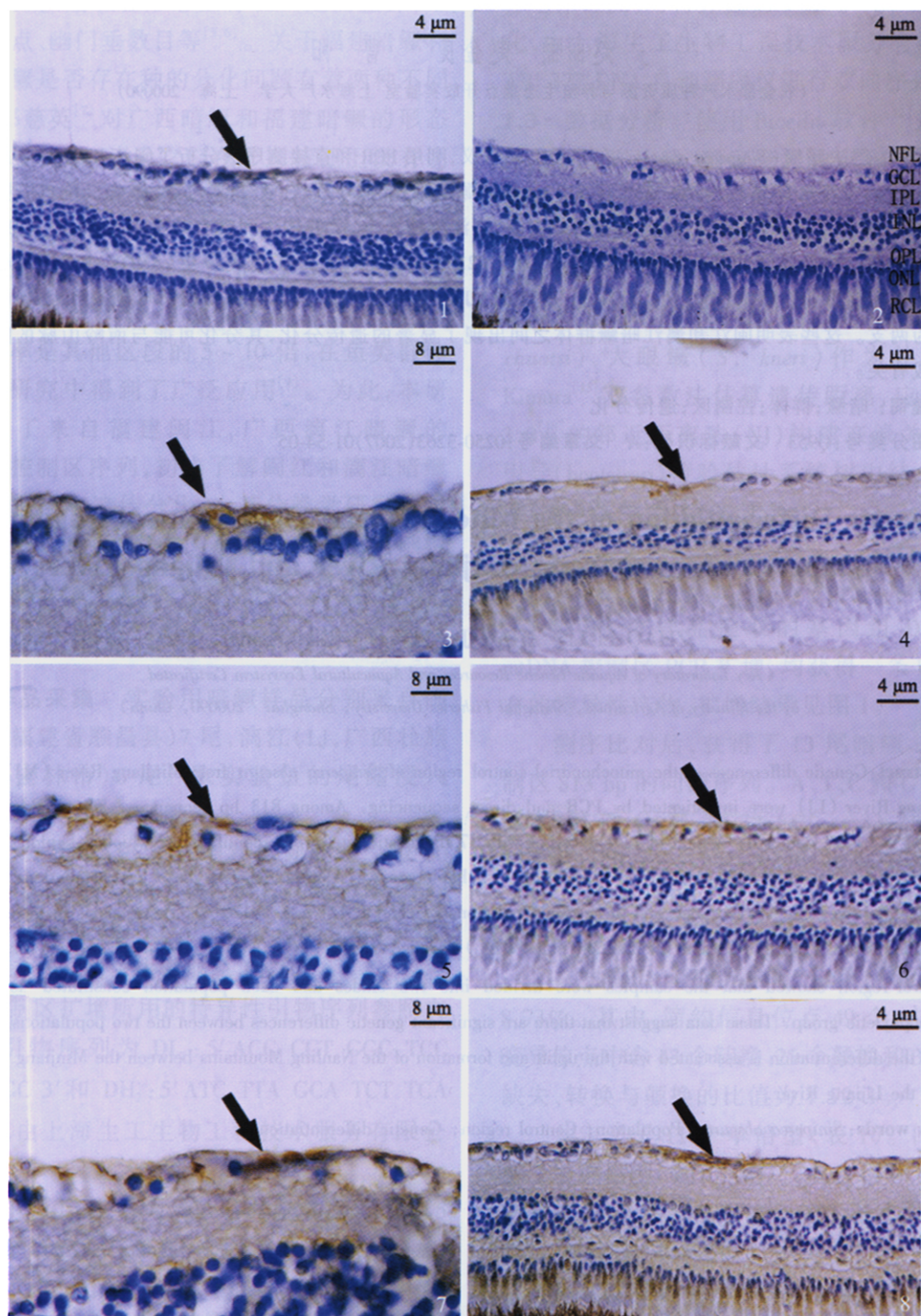
RCL :Rods and cones layer ;ONL :Outer nuclear layer ;OPL :Outer plexiform layer ;INL :Inner nuclear layer ;IPL :Inner plexiform layer ;GCL :Ganglion cells layer ;NFL :Nerve filament layer ;↑ S100-IR cells.

万 安等:环境无机汞对泥鳅视网膜 S100 表达影响

图版 I

WAN An *et al.*: Exposure to Inorganic Mercury Affects S100-expression
in the Retina of Loach

Plate I



图版说明见文后