

百草枯致神经发育毒性的研究进展

严梦玲, 周志俊, 常秀丽

摘要: 百草枯是目前世界上使用最广泛的除草剂之一。它的急性毒性和长期低剂量接触所致的神经毒性一直被人们关注, 对机体神经发育产生的影响也不容忽视。本文以近年来国内外有关百草枯神经发育毒性的研究为基础, 综述其流行病学研究、实验动物研究以及可能的毒性机制等方面研究进展; 结合本课题组的已有研究, 提示百草枯的神经发育毒性可能与帕金森病发展密切相关, 应予以广泛关注。

关键词: 百草枯; 神经发育毒性; 毒作用机制

Research Progress on Neurodevelopmental Toxicity of Paraquat YAN Meng-ling, ZHOU Zhi-jun, CHANG Xiu-li (School of Public Health/Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education/WHO Collaborating Center for Occupational Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). Address correspondence to CHANG Xiu-li, Email: xlchang@shmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: Paraquat is one of the most widely used herbicides across the world. Its acute and chronic neurotoxicity have long been concerned. Recently, its neurodevelopmental effect receives increasing attentions. This review, based on recent domestic and international literatures on paraquat's developmental neurotoxicity, summarizes results of epidemiological or animal studies and possible mechanisms of toxicity. In combination with our previous studies, it is tempting to propose a close relationship between paraquat's neurodevelopmental toxicity and Parkinson's disease, which should be more widely concerned.

Key Words: paraquat; developmental neurotoxicity; toxicity mechanism

百草枯(Paraquat, PQ)是一种在国内外广泛使用的非选择性除草剂。自1994年湖北某公司采用中温钠法首次生产以来, PQ在国内的生产规模迅速扩大, 使用量也逐年增加, 伴随而来的是其所致急性中毒和低剂量接触后的长期健康效应已受到普遍关注。研究发现, PQ结构与公认的神经毒素1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)的活性代谢产物MPP⁺相似, 可被血脑屏障上高表达的氨基酸载体主动摄取携带穿过血脑屏障进入脑组织, 具有与神经毒素MPTP相似的选择性破坏黑质致密部多巴胺能神经元的作用, 产生类似于帕金森病(Parkinson's disease, PD)的症状。同时, 在对PQ所致明显的胚胎毒性和发育毒性的研究中发现, PQ具有胚胎致死和致畸毒性^[1], 幸存后代生长发育不良率增高并且大脑发育迟缓^[2]。本

文重点以近10年来国内外对PQ神经发育毒性及其可能机制的研究文献为基础, 对PQ致神经发育毒性的研究进展作一综述报道。

1 PQ的神经发育毒性

1.1 整体动物实验研究

动物研究表明, 成年后出现的PD与新生期暴露于PQ有关^[3-4]。研究发现, 新生小鼠脑发育高峰期(即出生后10~11天)暴露于一定剂量的PQ会对成年后的神经行为功能产生影响, 即使剂量较低也可引起永久性的脑功能改变, 多巴胺(dopamine, DA)减少, 黑质纹状体也发生相应的生化病理改变, 使小鼠成年后出现类似于PD的行为表现^[5]。Thiruchelvam等^[3]研究发现, 脑发育关键期(出生后10天)暴露PQ可产生极微小的变化, 但在成年之后再次暴露可引起黑质细胞数和DA的显著下降。Barlow等^[6]也发现, 小鼠胚胎期暴露PQ或代森锰(maneb, 一种广谱杀菌剂)可增加其成年后对PQ的易感性。这些研究均提示, 胚胎期及新生期暴露PQ可产生黑质纹状体多巴胺系统的永久和渐进性病变, 且发育早期暴露于神经毒物产生沉默毒性的状

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14401

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81472996)

[作者简介] 严梦玲(1991—), 女, 硕士; 研究方向: 神经发育毒性;

E-mail: 13211020073@fudan.edu.cn

[通信作者] 常秀丽, E-mail: xlchang@shmu.edu.cn

[作者单位] 复旦大学公共卫生学院/教育部公共卫生重点实验室/WHO职业卫生合作中心, 上海 200032

态,在成年后再暴露时表现出增强成年期的易感性,提示发育期暴露于神经毒物可能参与了诱发神经退行性疾病和(或)改变其正常的老化过程。此外,Morris水迷宫实验显示,PQ处理后的动物反应潜伏期明显延长,小鼠的学习和记忆能力也受到严重的影响^[7]。

1.2 体外细胞研究

有研究者利用大鼠小脑粒细胞(CGCs)模拟神经发育,PQ染毒后检测其神经发育毒性。研究发现,在暴露于PQ之后,与神经元分化有关的NF-68和NF-200的mRNA表达水平显著下调;与神经细胞功能成熟有关的神经元受体NMDA-R和GABA_A-R也显著减少;与星形胶质细胞增殖分化有关的GFAP和S100 β 表达没有明显改变;而与神经前体细胞有关的巢蛋白明显增加,Sox10表达无明显改变,提示PQ可能通过调节氧化应激,特异性地影响了神经元细胞,而星形胶质细胞可能由于对氧化应激的抵抗力较强而不受影响。巢蛋白mRNA的增加而Sox10表达没有改变,可能由于PQ损伤了神经元细胞,同时激活了星形胶质细胞对神经元的保护,而并非增加了前体细胞的增殖^[8]。本课题组用人的神经胚胎祖细胞的研究也发现,PQ可影响Notch信号通路分子和Wnt信号通路分子的表达,进而影响神经干细胞的增殖和分化;同时也观察到PQ对小鼠神经干细胞增殖的抑制并诱导其发生凋亡^[9-10]。

1.3 人群研究

流行病学研究认为,婴幼儿先天畸形与出生前暴露于PQ有关,且在儿童发育的关键期暴露于PQ会对儿童大脑功能发育产生有害影响^[11]。但由于与PQ暴露相关的疾病(例如PD)常在生命后期发生,典型的病人很少有父母或兄弟姐妹能准确叙述幼时的暴露情况,很难获得发育早期关于暴露的确切信息;对于前瞻性的队列研究,需要长达数十年的监测和随访,且所需样本量巨大;暴露与疾病出现之间有很长的潜伏期,在研究没有达到发病窗口期时,会有很多“临床前病人(pre-patients)”被误划分为正常对照组,使结果偏向于DA功能正常随年龄增加而下降,从而低估PQ的毒性作用^[12]。故PQ的人群流行病学研究的开展尚存在一系列的挑战。

2 PQ神经发育毒性的可能机理

2.1 PQ对细胞的氧化损伤

研究发现,暴露于PQ可引起细胞线粒体损害,

产生自由基,导致重要的生化步骤中断;且发生的氧化应激超过机体的消除能力和抗氧化防御,引起DNA损伤和细胞、组织的死亡^[13]。体内研究发现,暴露于PQ可破坏小鼠的海马区,使海马区的丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平和活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生显著增加,总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性显著降低,增强了海马的脂质过氧化,导致海马神经元细胞的线粒体损伤,致使能量合成减少,线粒体DNA(mtDNA)中的8-OHdG水平显著增加,引起mtDNA的氧化损伤^[7]。PQ也可通过氧化还原反应形成ROS产生一系列细胞毒现象,抑制突触合成和释放神经递质,引发线粒体功能异常,引起脂质过氧化,诱使神经细胞发生凋亡或坏死^[14-16];同时其通过抑制线粒体复合物的活性,使线粒体发生功能障碍,导致线粒体内膜上的脂质发生过氧化,而使其损伤,间接地引发N27细胞的凋亡^[17]。PQ还可通过引起早期内质网应激反应,激活凋亡信号调节激酶1(ASK1)的表达,引起自噬反应,当毒素持续存在时,诱导神经元细胞发生凋亡,使神经细胞减少,导致神经病学功能紊乱,引起神经退行性疾病的发生^[18-19]。研究发现,在神经系统发育的关键期,即神经细胞分化和突触发生的高峰期,对氧化损伤更敏感,即使在低于系统毒性的小剂量暴露下,也能检测到脂质硫代巴比妥酸反应产物(TBARS)的显著升高^[20]。

胎儿和新生儿在发育过程中由于自由基损伤,可导致儿童智力发育迟钝,学习能力缺乏,25%~50%出现神经发育缺陷,50%出现严重的自主、认知以及行为功能混乱^[13]。用PQ处理人类神经胚胎干细胞(hNPCs)后检测发现,PQ能通过增加ROS的产生而诱发氧化应激,Caspase-3活性、钙离子浓度均显著升高,细胞内氧化还原系统失衡引起hNPCs细胞的凋亡^[10]。同时,我们也发现,一定剂量的PQ可抑制hNPCs细胞Wnt信号通路中关键分子 β -catenin和DVL2基因mRNA的表达,影响神经干细胞的分化过程^[21],也可通过影响Notch信号通路中的Notch1和Jagged1、DTX1的表达,使NSCs提前启动细胞分化,造成干细胞池中干细胞数目不足,从而影响最终神经细胞的数目以及大脑皮层的厚度,导致神经异常或者智力低下^[22]。由上可见,氧化损伤作为PQ引起神经元细胞受损凋亡的关键因素,亦是影响神经发育的机制。

2.2 PQ致PD的多次冲击学说

研究表明, PQ的暴露可引起多巴胺神经元缺失, 黑质纹状体多巴胺系统退化, 导致 α -突触核蛋白聚合, 且PQ可能与 α -突触核蛋白折叠的中间部分有高度亲和力, 相互结合后引起 α -突触核蛋白的构象改变, 促进原纤维形成, 增加 α -突触核蛋白的神经毒性作用, 而突触前聚集的大量 α -突触核蛋白正是PD患者神经元内Lewy小体(LBs)的主要成分, 从而引起大脑退行性变, 引发PD^[15]。而围产期或出生后发育期暴露于PQ, 对神经发育形成第一次冲击(hit), 由于血脑屏障发育不完全等原因, 大脑摄入PQ较多, 黑质纹状体多巴胺系统受损, 引起纹状体多巴胺代谢物增加, 多巴胺突触释放的减少, 黑质致密部TH+神经元选择性减少, 产生潜在的神经毒性, 但此种神经毒性仅为临床不明显的持久性形态学和生化损伤, 可被机体补偿机制所掩盖、潜伏和积累, 此时尽管神经发育已经受损, 临床表现却为正常, 称为“沉默毒性”, 其提高了机体对后期暴露的易损性。当生命后期再次暴露于环境毒物, 或是机体病理生理学应激, 甚至是正常的发育和老化, 都可能对神经发育造成二次冲击, 使损伤进一步累积。多次冲击联合作用产生的损伤超过补偿的界限, 达到临床发病的阈值, 即引起诸如PD等神经发育性疾病的发生^[12, 23]。

2.3 PQ-基因-表观遗传的相互作用

研究发现, 有10%~15%的PD为家族聚集型, 而环境危险因子的影响在PD病因学中也已被证明, 流行病学研究提示, PD是一种多病因型疾病, 故有研究利用基因敲除和转基因技术来研究PQ暴露与基因的交互作用。研究发现, 小鼠在新生期暴露于PQ, 使多巴胺神经元对神经元保护基因如PINK1表达沉默变得更敏感, 导致多巴胺神经元退行性变, 神经元累积性的损害以及多巴胺神经元明显的缺失, 降低了神经退行性疾病如PD发展的阈值, 增加疾病的发病率; 在环境毒物移除之后, 缺失的多巴胺能神经元也无法得到修复^[23]。利用转基因技术使SNCA或LRRK2(G2019S)基因发生突变的同时, 将小鼠环境暴露于PQ, 两者联合作用可使细胞中与分化、增殖、凋亡、转录、迁移等相关的基因表达发生巨大改变, α -突触核蛋白蓄积, 小鼠体内神经前体细胞和增殖细胞明显减少, 引起细胞变异, 影响小鼠的神经发生^[24]。由上可见, 环境毒物PQ可与多种基因产生相互作用, 共同干扰神经元细胞的正常生长, 影响神经系统的发育。

组蛋白乙酰化也能通过调控基因表达和染色体重塑影响细胞的存活和死亡, 故组蛋白乙酰化可看成神经退化性疾病的关键进程。N27多巴胺能细胞暴露于PQ 6h后, 即可引起时间依赖性的组蛋白H3的乙酰化, 在12h后乙酰化程度最大; 同时, 在PQ暴露的12h和24h后, 也发现组蛋白H4乙酰化的增加。进一步研究发现, PQ通过抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性, 尤其是HDAC4和HDAC7的活性, 引起组蛋白的乙酰化, 从而激活凋亡因子caspase-3, 引起N27细胞发生凋亡。利用组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)抑制剂腰果酸处理, 抑制组蛋白乙酰化, 则发现其可对PQ引起的N27多巴胺能细胞凋亡产生保护作用; 而利用HDAC抑制剂NaBu(sodium butyrate)处理, 增加组蛋白乙酰化, 发现其可加重PQ引起的细胞凋亡, 进一步验证了组蛋白乙酰化和细胞凋亡的关系^[25]。故可推测, PQ暴露可能引起机体表观遗传的改变, 影响体内生化关键酶的表达, 使神经细胞内平衡失调, 引起细胞凋亡, 进而影响神经系统的发育。

3 结语

综上所述, 作为一种除草剂, PQ的大量使用引起了人们对其急性和慢性健康效应的关注, 而近年来其对人体神经系统的发育毒性也逐渐引起了人们的担忧。基于PD的胎源性成人病有关的假说, 动物研究证实发育期PQ暴露可能引起渐进的、长期累积的黑质纹状体多巴胺系统神经毒性, 并增加机体对随后环境损害的易感性; 人群研究提示, 儿童发育期的PQ暴露, 可对大脑功能发育产生有害影响, 可能与老年期PD的发生有关, 但其机制尚需进一步深入研究。由于神经发育关键期任何轻微的改变均可能导致成年期神经功能不可逆损伤或者对相关疾病易感性的增加, 故PQ暴露造成的神经发育毒性影响应当引起足够重视。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 夏勇, 郑云燕, 宋燕华, 等. 百草枯对斑马鱼的生理指标和胚胎发育影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(5): 271-276.
- [2] Vismara C, Battista V, Vailati G, et al. Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development[J]. Aquat

- Toxicol, 2000, 49(3): 171-179.
- [3] Cory-Slechta D A, Thiruchelvam M, Barlow B K, et al. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(9): 1263-1270.
- [4] Cory-Slechta D A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk[J]. Neurotoxicology, 2005, 26(4): 491-510.
- [5] Fredriksson A M, Fredriksson, Eriksson P. Neonatal exposure to paraquat or MPTP induces permanent changes in striatum dopamine and behavior in adult mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1993, 122(2): 258-264.
- [6] Barlow B K, Richfield E K, Cory-Slechta D A, et al. A fetal risk factor for Parkinson's disease[J]. Dev Neurosci, 2004, 26(1): 11-23.
- [7] Chen Q, Niu Y, Zhang R, et al. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: involvement of oxidative stress[J]. Neurotoxicology, 2010, 31(3): 310-316.
- [8] Hogberg H T, Kinsner-Ovaskainen A, Hartung T, et al. Gene expression as a sensitive endpoint to evaluate cell differentiation and maturation of the developing central nervous system in primary cultures of rat cerebellar granule cells (CGCs) exposed to pesticides[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 235(3): 268-286.
- [9] 吕文, 常秀丽, 吴庆, 等. 百草枯对体外培养小鼠胚胎神经干细胞增殖的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(1): 25-28.
- [10] Chang X, Lu W, Dou T, et al. Paraquat inhibits cell viability via enhanced oxidative stress and apoptosis in human neural progenitor cells[J]. Chem Biol Interact, 2013, 206(2): 248-255.
- [11] Garcia A M, Benavides F G, Fletcher T, et al. Paternal exposure to pesticides and congenital malformations[J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(6): 473-480.
- [12] Barlow B K, Cory-Slechta D A, Richfield E K, et al. The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder[J]. Reprod Toxicol, 2007, 23(3): 457-470.
- [13] Sharda B. Free radicals: emerging challenge in environmental health research in childhood and neonatal disorders[J]. Int J Environ Res Public Health, 2006, 3(3): 286-291.
- [14] 武柏林, 刘怀军. 百草枯的中枢神经系统毒性[J]. 脑与神经疾病杂志, 2011, 19(1): 75-78.
- [15] 姜丹, 常秀丽, 周志俊. 百草枯暴露致帕金森病的机制研究[C]//中国环境诱变剂学会第14届学术交流会议. 哈尔滨, 2009.
- [16] 马华丰, 张希洲. 百草枯中毒所致细胞毒性的机制及其药物治疗研究新进展[J]. 临床急诊杂志, 2012, 13(1): 68-71.
- [17] 陈震, 陈平, 徐雍羽, 等. 不同神经毒素对神经细胞 Caspase-3 影响的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(4): 475-477.
- [18] Thiruchelvam M, Richfield E K, Goodman B M, et al. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype[J]. Neurotoxicology, 2002, 23(4/5): 621-633.
- [19] Niso-Santano M, Bravo-San Pedro J M, Gómez-Sánchez R, et al. ASK1 overexpression accelerates paraquat-induced autophagy via endoplasmic reticulum stress[J]. Toxicol Sci, 2011, 119(1): 156-168.
- [20] Slotkin T A, Oliver C A, Seidler F J. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 157(2): 172-180.
- [21] 窦婷婷, 常秀丽, 吕文, 等. 百草枯对人胚胎神经干细胞分化过程中 Wnt 通路分子表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2013, 30(6): 411-415.
- [22] 常秀丽, 吕文, 窦婷婷, 等. 百草枯对胚胎神经干细胞分化过程中 Notch 信号通路分子表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2013, 31(7): 492-495.
- [23] Zhou H, Huang C, Tong J, et al. Early exposure to paraquat sensitizes dopaminergic neurons to subsequent silencing of PINK1 gene expression in mice[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(8): 1180-1187.
- [24] Desplats P, Patel P, Kosberg K, et al. Combined exposure to Maneb and Paraquat alters transcriptional regulation of neurogenesis-related genes in mice models of Parkinson's disease[J]. Mol Neurodegener, 2012, 7: 49.
- [25] Song C, Kanthasamy A, Jin H, et al. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration[J]. Neurotoxicology, 2011, 32(5): 586-595.

(收稿日期: 2014-06-09)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 郑轻舟)