

综述

三聚氰胺对中枢神经系统毒性的研究进展

杨佳佳¹, 安磊¹, 杨卓², 张涛^{1*}南开大学¹生命科学学院; ²医学院, 天津 300071

摘要: 近几年对三聚氰胺毒性的研究越来越得到重视。一般认为三聚氰胺生物学效应的主要靶器官是泌尿系统, 中毒机制是肾衰。然而已有更多的研究表明三聚氰胺存在其它的生物学作用, 但三聚氰胺的毒性机制尚未被完全阐明。众所周知, 哺乳动物胎儿期和婴幼儿期是神经系统发育的关键阶段。三聚氰胺能够通过胎盘及血脑屏障对胎儿中枢神经系统产生毒性作用, 并可能导致认知功能损伤。本文综述了近年来三聚氰胺对中枢神经系统毒性研究的相关报道, 为进一步了解三聚氰胺对婴幼儿的危害, 特别是对中枢神经系统的影响提供实验结果。

关键词: 三聚氰胺; 中枢神经系统; 离子通道; 学习记忆; 突触传递与突触可塑性

中图分类号: R338; Q426

Progress in mechanisms underlying melamine toxicity in central nervous system

YANG Jia-Jia¹, AN Lei¹, YANG Zhuo², ZHANG Tao^{1*}¹College of Life Science; ²College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: In recent years there have been more widely and deeply studies in investigating melamine toxicity. Generally, it is believed that the main target of melamine is the urinary system. However, previous studies revealed that it also had additional biological actions. Obviously, the toxicity mechanisms of melamine have not been fully clarified. It is well known that fetus and infant periods play the most fundamental role in the brain development. And melamine can pass through the placental and blood-brain barrier, and then exerts toxic effects on the central nervous system. This article reviewed the reports about the topic in recent years, for better understanding the dangers of melamine to infants and providing experimental data for further study.

Key words: melamine; central nervous system; ion channels; learning and memory; synaptic transmission and plasticity

三聚氰胺 (melamine), 化学名称为 2, 4, 6 - 三氨基 - 1, 3, 5 - 三嗪, 是一种三嗪类含氮有机杂环化合物。外观为粉末状, 白色无味, 与蛋白粉极为相似。它是一种重要且用途广泛的有机化工中间体原料。其最主要的用途是生产三聚氰胺甲醛树脂。在日常生活中人们经常能接触到很多以三聚氰胺为原料制成的各种生活用品, 如“美耐皿”塑料碗碟和食品包装袋^[1, 2]。有研究发现三聚氰胺在哺乳动物体内广泛分布且能够在体内各组织中累积^[3]。作为毒奶

粉事件的罪魁祸首, 近几年对其毒性机理的研究报道有所增加。目前广泛认为三聚氰胺生物学效应的主要靶器官是泌尿系统, 其中毒机制是肾衰^[2, 4, 5]。但也有一些研究表明三聚氰胺还有其它的生物学作用, 如诱发皮肤过敏、引起肝脏坏死、导致细胞凋亡、诱发癌症、对 DNA 结构的改变、导致红细胞溶血以及对免疫系统、生殖遗传系统的毒性等^[6-12]。因此三聚氰胺的毒性机制目前尚未被完全阐明。

三聚氰胺对于婴幼儿的危害作用大于成年人,

Received 2011-10-19 Accepted 2011-12-12

This review was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31171053, 30870827, 31070964).

*Corresponding author. Tel: +86-22-23500237; E-mail: zhangtao@nankai.edu.cn

主要是由于某些器官和组织发育不完全，例如肾脏和大脑。众所周知，哺乳动物胎儿期和婴幼儿时期是大脑发育的关键时期，包括神经元数量的增长和突触发生的形成，这是学习和记忆的生物学基础^[13, 14]。有报道称，三聚氰胺能够通过哺乳动物的胎盘及血脑屏障，在胎鼠体内和幼鼠大脑的各个脑区都发现有三聚氰胺，并且随着时间的延长，含量逐渐增高^[3]。相关文献中急性毒性实验显示中毒动物有不安、呼吸急促、精神不振、反应迟钝、闭眼伏卧、不食等症状^[15]。以上研究提示，三聚氰胺对于幼年哺乳动物的中枢神经系统会产生毒性作用，并进而损害其认知功能。本文就近年来关于三聚氰胺神经毒性研究的报道作一综述，为进一步了解三聚氰胺的神经毒性提供实验基础。

1 三聚氰胺对神经细胞的毒性作用

Han 等^[16]将三聚氰胺作用于分化的 PC12 细胞（一种常用的神经元模型）上，MTT 实验结果显示三聚氰胺能够以浓度和时间依赖的方式抑制 PC12

细胞的增殖。之后的染色观察三聚氰胺处理后的 PC12 细胞发现其形态学也发生异常，可见凋亡及坏死特征（见图 1）。进一步流式细胞仪检测显示，三聚氰胺能够使得细胞凋亡率浓度依赖性增加，在最大浓度时达到 50% 左右，而坏死细胞的比例很小。一个更直接的证据是 Wang 等^[17]在 2011 年发表的结果，他们将浓度为 312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三聚氰胺作用于培养的海马神经元，12 h 后发现细胞发生了病理性改变，包括细胞皱缩、染色质浓缩，并可见不溶性代谢产物。细胞内 Ca^{2+} 荧光强度以及 caspase-3 活性增强。由于 caspase-3 是细胞凋亡过程中一个关键因子，说明三聚氰胺促进了海马神经元的凋亡。这与 Han 等^[16]在 PC12 细胞上的研究结果一致。并且他们认为三聚氰胺对神经元的损伤主要是由于其进入细胞并形成不溶性的代谢产物造成的。

2 三聚氰胺对脑片神经元的急性毒性作用

神经系统是由神经元组成的通讯网络系统。神经元是可兴奋性细胞，它们之间通过电信号进行联

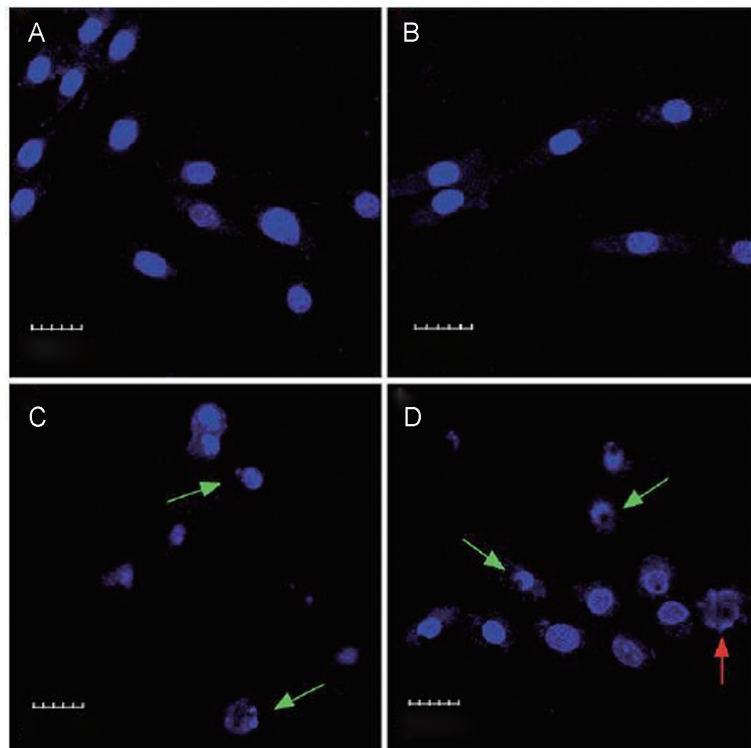


图 1. Hoechst 33342 染色观察不同浓度三聚氰胺处理 24 h 后的 PC12 细胞的共聚焦显微照片

Fig. 1. Hoechst 33342 staining of PC12 cells cultured in melamine for 24 h (confocal microscope images). A: Control. B: 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ melamine. C: 1980 $\mu\text{g}/\text{mL}$ melamine. D: 3300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ melamine. The green arrow shows typical form of half-moon in apoptotic cells. The red arrow shows necrotic cells with fragmented chromatin and disintegrated membrane. Scale bar, 20 μm . Adopted with permission from Han *et al.* (2011)^[16].

络和传递,其功能的实现与兴奋性密切相关。因此 Yang 等 (2010) [18,19] 在前期细胞实验的基础上 [19], 利用电生理学的技术手段检测了三聚氰胺对大鼠海马神经元的急性作用。为了能更好地模拟婴幼儿接触三聚氰胺的情况, 实验选用了哺乳期内的大鼠幼仔进行急性实验。结果显示, 三聚氰胺能够以浓度依赖的方式影响神经元的兴奋性, 并改变动作电位的波形。在 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} g/mL 两个浓度时, 三聚氰胺增加了海马神经元自发放电的频率, 对膜电位没有明显的影响。对动作电位波形的影响包括: 显著降低其发生阈值, 并浓度依赖性地增加其半峰宽 (AP half-width), 而对于其峰值和超射值的影响不大 (见图 2)。

由于细胞膜上的各种电压门控离子通道是决定神经元兴奋性的分子基础。许多已知的药物、毒物等都是通过离子通道对神经元产生作用的。而动作电位形成的离子基础是两种主要的电压门控离子电流: 电压门控钠电流 (I_{Na}) 和电压门控钾电流 (分为瞬时外向钾电流 I_A 和延迟整流钾电流 I_K)。因此 Yang 等 [18,19] 进一步检测了三聚氰胺对这三种电流的作用。结果显示三聚氰胺能够以浓度依赖的方式抑制 I_{Na} 的幅值, 但抑制程度较弱, 同时改变了钠

通道的激活和失活过程 [18]。这可能是三聚氰胺导致动作电位的幅值以及发生阈值降低的原因之一。

同样三聚氰胺能够以浓度依赖的方式降低 I_A 以及 I_K 的幅值, 使得 I_K 激活曲线左移, I_A 的失活曲线向超极化方向改变, 并且增加其斜率 [19]。由于 A 型钾通道的分布在调控动作电位的反向传播中发挥重要的作用, 通常状态下离胞体越远, 分布密度越大, 从而防止神经元过度兴奋 [20,21]。因此 Yang 等认为三聚氰胺导致 A 型钾通道出现异常造成的 I_A 减少, 可以导致神经元过度兴奋, 进而引起癫痫。而 I_K 幅值的降低, 可能是使动作电位半峰宽增加的原因。以上这些研究结果表明, 幼年动物急性接触较高浓度的三聚氰胺, 会对其中枢神经系统中神经元的电生理学特性产生影响。

3 三聚氰胺对大鼠认知功能的影响

海马在哺乳动物神经系统中占有重要的一席之地, 特别是与学习记忆等高级认知功能密切相关 [22]。三聚氰胺既然对神经元具有毒性作用, 那么它是否对幼年动物的认知功能也会产生负面影响呢? 2011 年, An 等 [23] 以及 Yang 等 [24] 以幼年 Wistar 大鼠为研究对象进行在体实验。通过连续 4 周每天以浓度

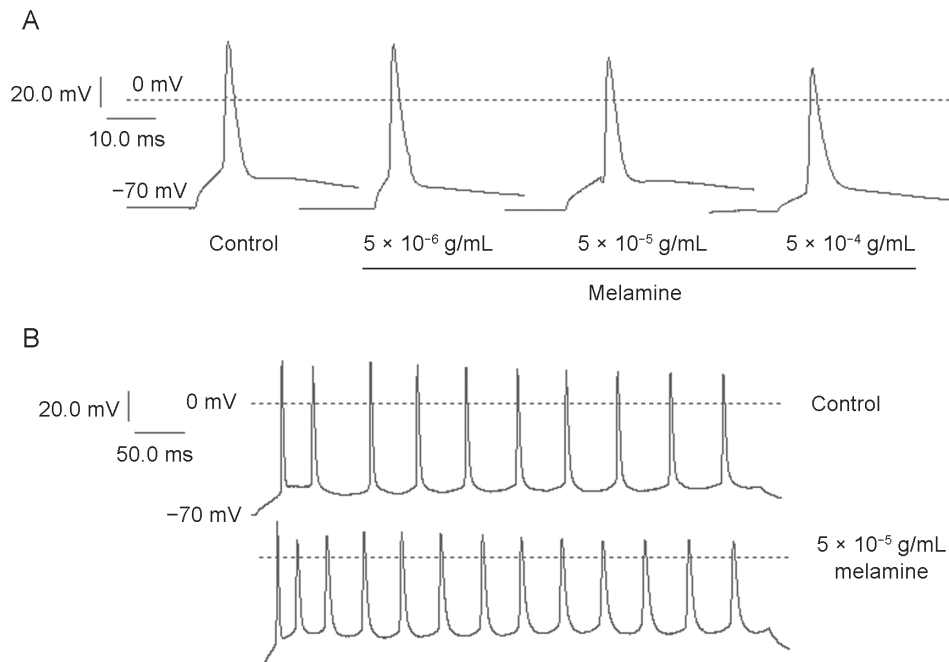


图 2. 不同浓度的三聚氰胺对单个动作电位(A)以及串动作电位发放(B)的影响

Fig. 2. Effect of melamine at different concentrations on single action potential (A) and action potential firing rate (B). Adopted with permission from Yang *et al.* (2010) [18].

为 300 mg/kg 的三聚氰胺对断奶大鼠 (出生后 21 d 左右) 进行灌胃, 建立实验模型大鼠。这一实验模型能够较好地模拟婴幼儿长期服用含有三聚氰胺奶粉的情况。模型建立后, 首先进行 Morris 水迷宫测试, 检测了模型组大鼠和对照组大鼠的空间学习记忆能力 (见图 3): 在定位航行阶段, 与对照组大鼠相比较, 模型组大鼠逃避潜伏期明显延长, 表明其学习能力受到损伤; 在空间探索阶段, 模型组动物在目标象限的逗留时间和穿越目标象限次数均明显减少, 显示其记忆和准确性亦受到影响。行为学实验表明, 大鼠在连续食用三聚氰胺后显著地损害了空间认知的能力 [23]。为了探索这一现象的细胞学机理, Yang 等进一步记录了大鼠海马区的 CA3-CA1 神经通路的长时程增强 (long-term potentiation, LTP),

并将模型组与对照组的 LTP 结果进行了比较。结果显示, 高频刺激 (high frequency stimulation, HFS) 后, 模型组大鼠的场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) 的斜率被明显抑制, 因此长期服用三聚氰胺将使海马神经元突触传递效能下降 (见图 4) [24]。由于 LTP 被认为是学习记忆的细胞学基础, 因此进一步得出连续给予幼鼠三聚氰胺会对其产生认知功能损伤的结论。

LTP 是衡量突触可塑性的重要标准之一, 上述海马区 CA3-CA1 的 LTP 结果表征了突触可塑性的改变。Yang 等 [24] 的研究进一步阐明了这种变化的分子生物学机制。在实验中采用了出生后 18~21 d 幼鼠的体外活性海马脑片。这种脑片能够较为完整地保持突触联系, 是研究突触传递的常见实验模型。

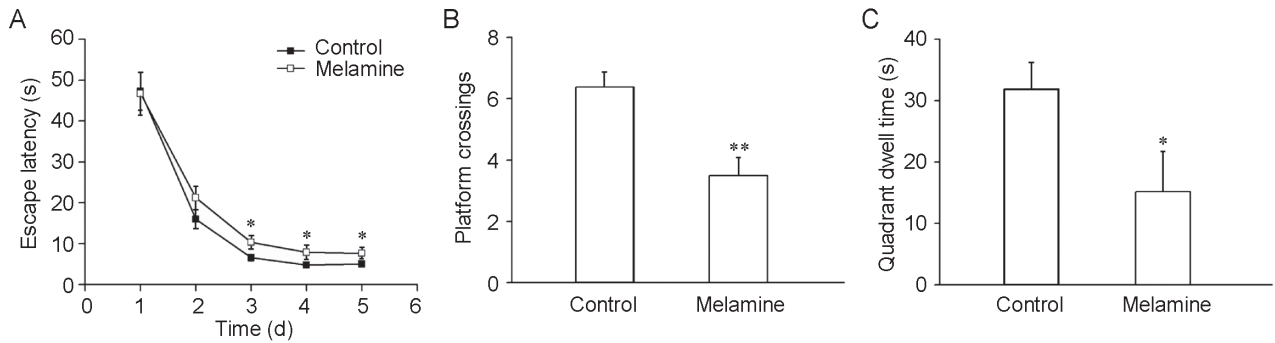


图 3. 三聚氰胺对大鼠水迷宫测试的影响

Fig. 3. Effect of melamine on rats' performance in MWM test. A: Mean escape latency calculated for each day in place navigation phase. B: Mean number of platform area crossings in spatial probe phase. C: Mean percentage of time in target quadrant in spatial probe phase. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 10$ in melamine group and $n = 8$ in control group. Adopted with permission from An *et al.* (2011) [23].

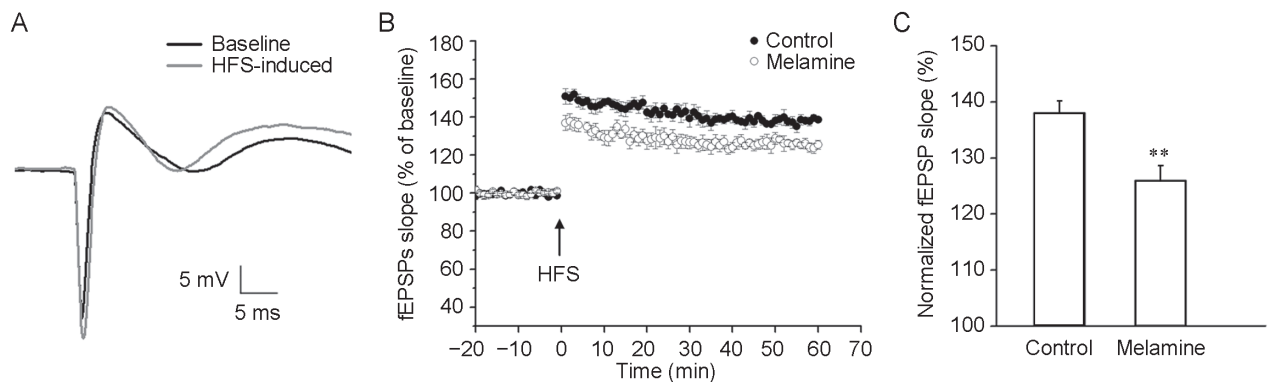


图 4. 三聚氰胺对海马区 CA3-CA1 神经通路 LTP 的影响

Fig. 4. Effects of melamine on LTP at CA3-CA1 pathway. A: Representative postsynaptic potential evoked by high frequency stimulation (HFS). B: Slopes of fEPSP were normalized to baseline and plotted against time. C: Bar graphs showed mean normalized fEPSP slope in the two groups. ** $P < 0.01$ vs control. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 10$ per group. Adopted with permission from Yang *et al.* (2011) [24].

通过记录并分析 CA1 区神经元的兴奋性突触后电流 (excitatory postsynaptic currents, EPSCs) 的性质来研究三聚氰胺对突触传递效能的影响。结果显示, 三聚氰胺能够显著地抑制 EPSCs 的频率而对其幅值影响甚微。如图 5 显示的是三聚氰胺显著地抑制了自发性 EPSCs (spontaneous EPSCs) 的频率, 而三聚氰胺对于微小 EPSCs (miniature EPSCs) 频率的抑制效果与之程度相同。目前普遍认为 EPSCs 的频率体现了突触前谷氨酸能神经元递质释放的概率, 而其幅值则体现了突触后谷氨酸受体的敏感性。因此三聚氰胺可能是通过抑制突触前递质的释放来抑制突触传递效能的。由于 CA1 区神经元主要接受来自 CA3 区神经元发出的 Schaffer 侧枝的投射^[25], 从 CA1 神经元上记录到的 EPSCs 能反映三聚氰胺对于这条通路突触传递的影响, 而谷氨酸能的突触

传递与 LTP 的形成密切相关。因此三聚氰胺对于幼鼠认知功能的损伤在分子水平上可能是由于其对突触前递质释放的抑制造成的。

4 三聚氰胺对神经元生化性质的改变

最近一篇关于三聚氰胺对肾脏毒性机制的研究^[26]表明, 三聚氰胺能够抑制肾脏 NRK-52e 细胞的增殖, 并改变细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 以及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性。这说明三聚氰胺能够使肾脏细胞产生氧化应激损伤并诱导其凋亡。类似的, 在神经细胞上, Han 等^[16]的实验通过检测 SOD 的水平发现三聚氰胺能引起 PC12 细胞氧化应激损伤。Ma 等^[27]的实验也揭示三聚氰胺毒性可能与体内氧化 - 抗氧

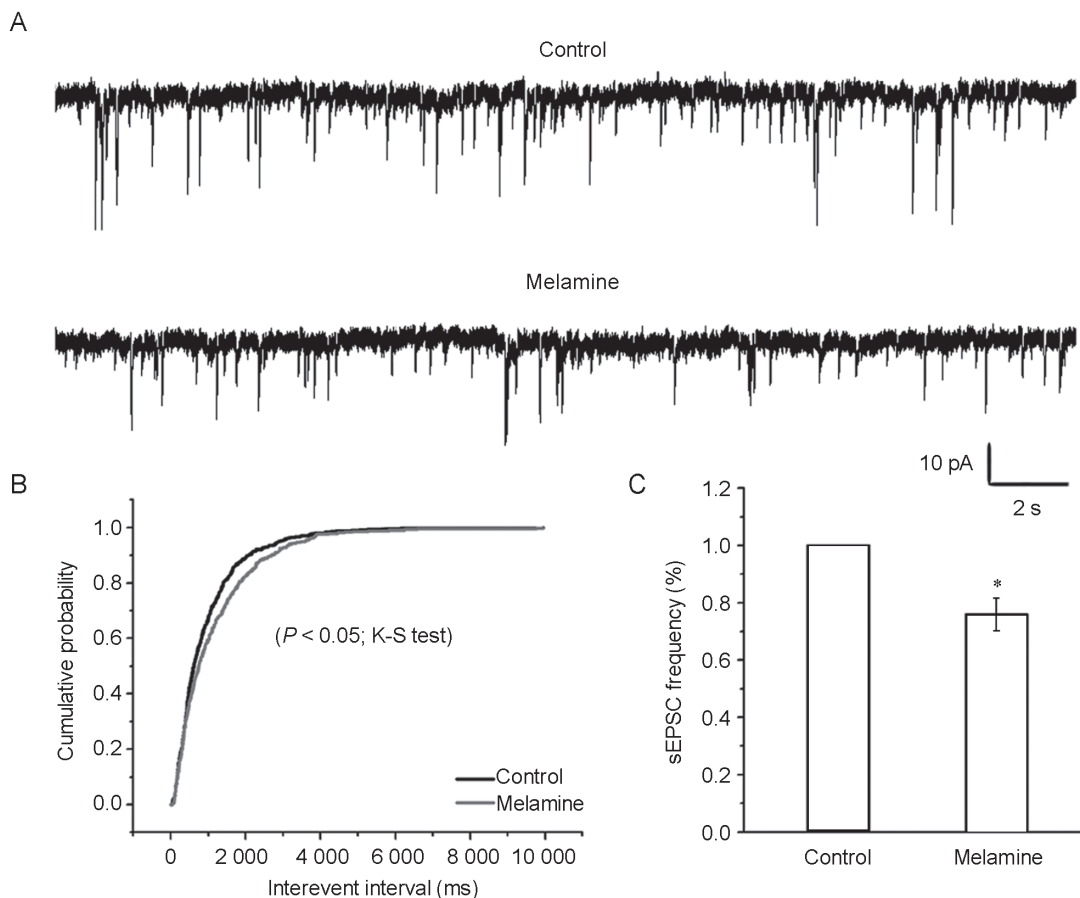


图 5. 三聚氰胺(5×10^{-5} g/mL)对自发性EPSCs频率的影响

Fig. 5. Effects of melamine (5×10^{-5} g/mL) on the frequency of spontaneous EPSCs (sEPSCs). *A*: Sample traces of sEPSCs before and after application of melamine. *B*: Cumulative interevent interval distributions of sEPSCs before and during application of melamine. *C*: Normalized frequency of sEPSCs in control and melamine treated slices ($n = 7$ per group). * $P < 0.05$ vs control. Adopted with permission from Yang *et al.* (2011)^[24].

化稳态的改变相关。本实验室也进行了在体模型动物一系列生化指标的检测(资料待发表),简单描述如下:已断奶的Wistar幼鼠在连续口服一定浓度的三聚氰胺4周后,经检测发现海马中的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)含量明显提高,这种氧化-抗氧化内稳态的紊乱极有可能是由分解ROS的酶活性的改变引起的。进一步检测后发现在大鼠海马中SOD和GSH-Px的活性明显降低,而MDA含量升高,该实验结果证实长期服用三聚氰胺将导致氧化损伤的发生。随后,我们还检测了海马中ATP含量的变化,发现三聚氰胺处理组海马ATP含量较正常组明显下降。表明三聚氰胺能够影响海马内正常的能量代谢。通过HE染色观察到海马CA1区神经元出现核固缩和死亡。这一现象与本实验室已有的细胞学研究结果,即三聚氰胺促进细胞凋亡的结论^[16]相一致。

5 总结与展望

本文仅就近几年发表的关于三聚氰胺对哺乳动物中枢神经系统毒性研究的进展作了一个简要的回顾。成年动物自身发育较完善以及代谢能力较强,而幼年动物对于一些毒性物质的抵抗力较低,因此目前关于三聚氰胺对神经系统毒性的研究主要集中在对幼年动物方面,而对于成年动物的毒性研究尚未见报道。因此,三聚氰胺对于成年动物是否具有毒性作用还需要通过相关的动物实验来证实。并且目前这些结果只是从大鼠中得到的,还需在其它动物特别是人类本身得到证实,从而取得更为可靠和系统的资料信息。虽然缺乏对于婴幼儿神经系统损伤方面的临床证据,但是不能排除是由于其自述性的缺乏以及其认知能力的相对低水平造成的。有很多研究正在追访处于三聚氰胺中毒后的恢复以及康复阶段的婴幼儿,其神经系统的发育情况同样不能被忽视。早期诊断、早期治疗,是使患儿早日康复的关键。

参考文献

- Chien CY, Wu CF, Liu CC, Chen BH, Huang SP, Chou YH, Chang AW, Lee HH, Pan CH, Wu WJ, Shen JT, Chang MY, Huang CH, Shiea J, Hsieh TJ, Wu MT. High melamine migration in daily-use melamine-made tableware. *J Hazard Mater* 2011; 188(1-3): 350-356.
- Hau AK, Kwan TH, Li PK. Melamine toxicity and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(2): 245-250.
- Wu YT, Huang CM, Lin CC, Ho WA, Lin LC, Chiu TF, Tarng DC, Lin CH, Tsai TH. Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009; 1216(44): 7595-7601.
- Guan N, Fan Q, Ding J, Zhao Y, Lu J, Ai Y, Xu G, Zhu S, Yao C, Jiang L, Miao J, Zhang H, Zhao D, Liu X, Yao Y. Melamine-contaminated powdered formula and urolithiasis in young children. *N Engl J Med* 2009; 360(11): 1067-1074.
- Zhang L, Wu LL, Wang YP, Liu AM, Zou CC, Zhao ZY. Melamine-contaminated milk products induced urinary tract calculi in children. *World J Pediatr* 2009; 5(1): 31-35.
- Wang C, Qin X, Huang B, He F, Zeng C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402(4): 773-777.
- Zhou W, Jiang Y, Shi H, Dai Q, Liu J, Shen C, Yang H. The characteristics of immune system changes in children who ingested melamine-contaminated powdered formula in China. *Int J Environ Health Res* 2010; 20(4): 289-297.
- Chu CY, Chu KO, Chan JY, Liu XZ, Ho CS, Wong CK, Lau CM, Ting TL, Fok TF, Fung KP, Wang CC. Distribution of melamine in rat fetuses and neonates. *Toxicol Lett* 2010; 199(3): 398-402.
- Kim SH, Lee IC, Lim JH, Shin IS, Moon C, Park SC, Kim HC, Kim JC. Effects of melamine on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 506-514.
- Camacho L, Kelly KP, Beland FA, Gamboa da Costa G. Gene expression of biomarkers of nephrotoxicity in F344 rats co-exposed to melamine and cyanuric acid for seven days. *Toxicol Lett* 2011; 206(2): 166-171.
- Zhang QX, Yang GY, Li JT, Li WX, Zhang B, Zhu W. Melamine induces sperm DNA damage and abnormality, but not genetic toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2011; 60(1): 144-150.
- Shen HY, Liu YQ, Gao J, Zhen HM, Zhu N, Li J. *In vitro* study of DNA interaction with melamine and its related compounds. *DNA Cell Biol* 2011; 30(4): 255-264.
- Blakemore SJ, Frith U. The learning brain: lessons for education: a precis. *Dev Sci* 2005; 8(6): 459-465.
- Johnson MH. Functional brain development in humans. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(7): 475-483.
- Jiang QG (江泉观), Ji YJ, Chang YX. *The Prevention Handbook of Environmental Chemical Toxicants*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004, 937 (Chinese).
- Han YG, Liu SC, Zhang T, Yang Z. Induction of apoptosis by melamine in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31(1): 65-71.
- Wang Y, Liu F, Wei Y, Liu D. The effect of exogenous

- melamine on rat hippocampal neurons. *Toxicol Ind Health* 2011; 27(6): 571–576.
- 18 Yang JJ, Yang Z, Zhang T. Action potential changes associated with impairment of functional properties of sodium channels in hippocampal neurons induced by melamine. *Toxicol Lett* 2010; 198(2): 171–176.
- 19 Yang JJ, Tian YT, Yang Z, Zhang T. Effect of melamine on potassium currents in rat hippocampal CA1 neurons. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(2): 397–403.
- 20 Magee JC, Carruth M. Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 1999; 82(4): 1895–1901.
- 21 Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 2004; 305(5683): 532–535.
- 22 Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR. The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze. *J Neurosci* 2007; 27(25): 6647–6654.
- 23 An L, Li Z, Yang Z, Zhang T. Cognitive deficits induced by melamine in rats. *Toxicol Lett* 2011; 206(3): 276–280.
- 24 Yang J, An L, Yao Y, Yang Z, Zhang T. Melamine impairs spatial cognition and hippocampal synaptic plasticity by pre-synaptic inhibition of glutamatergic transmission in infant rats. *Toxicology* 2011; 289(2-3): 167–174.
- 25 Ahmed MS, Siegelbaum SA. Recruitment of N-Type Ca^{2+} channels during LTP enhances low release efficacy of hippocampal CA1 perforant path synapses. *Neuron* 2009; 63(3): 372–385.
- 26 Guo C, He Z, Wen L, Zhu L, Lu Y, Deng S, Yang Y, Wei Q, Yuan H. Cytoprotective effect of trolox against oxidative damage and apoptosis in the NRK-52e cells induced by melamine. *Cell Biol Int* 2012; 36(2): 183–188.
- 27 Ma C, Kang H, Liu Q, Zhu R, Cao Z. Insight into potential toxicity mechanisms of melamine: an in silico study. *Toxicology* 2011; 283(2–3): 96–100.