

鼻腔滴入 Fe₂O₃ 细颗粒在小鼠嗅球中的 微区分布及对其他微量元素的影响*

汪冰^{1,2} 丰伟悦^{1;1)} 王萌^{1,2} 史俊稳^{1,2} 张芳¹ 欧阳宏¹
赵宇亮¹ 柴之芳¹ 黄宇营³ 谢亚宁³

1 (中国科学院高能物理研究所纳米材料生物效应实验室和核分析实验室 北京 100049)

2 (中国科学院研究生院 北京 100049)

3 (中国科学院高能物理研究所同步辐射国家实验室 北京 100049)

摘要 用同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 微区扫描分析技术研究了经鼻吸入三氧化二铁 (Fe₂O₃) 细颗粒后, Fe 在小鼠嗅球中的分布及其对 Ca, Zn, Cu 等其他微量元素分布的影响. 研究发现经鼻吸入 40 mg/kg 体重 Fe₂O₃ (60—200nm) 细颗粒, Fe 可以通过鼻粘膜在小鼠嗅球中富集. 小鼠嗅球切片中 Fe 的浓度比对照组升高了 20%. 通过 SRXRF 微区扫描分析发现, Fe 在嗅球的嗅神经纤维层 (ON)、突触小球层 (GI) 和前嗅核外部 (AOE) 的浓度比对照组显著升高, 表明 Fe₂O₃ 颗粒已经由初级嗅神经进入到嗅球小球层, 进而沿次级嗅神经进入前嗅核外部 (AOE). 同时, 吸入 Fe₂O₃ 细颗粒还使小鼠嗅球中 Ca 浓度比对照组分别升高了 12%, Zn 的浓度则下降了 17%, 而 Cu 的浓度与对照组接近, 但 Cu 在嗅球各层中的分布发生了明显变化. 升高的 Ca 主要分布在嗅神经层和小球层. 实验组嗅神经层、小球层和外丛层 (EPI) 中 Cu 的浓度与对照组相比有显著升高, 而在前嗅核外侧部 (AOL)、前嗅核外部 (AOE)、副嗅球颗粒细胞层 (GrA) 和副嗅球 (AOB) 层中浓度降低了. 说明进入脑嗅球组织中的 Fe 已经对脑组织中微量元素的含量和分布产生了影响.

关键词 Fe₂O₃ 细颗粒 SRXRF 嗅球 元素分布

1 引言

多年的流行病学调查及动物实验研究发现大气颗粒物中细颗粒物(空气动力学直径 < 2.5 μ m) 和超细颗粒物(空气动力学直径 < 100nm) 是影响人体健康的重要组分^[1, 2]. 由于单位浓度下细和超细颗粒物具有巨大的表面积和颗粒物数量浓度, 在肺组织和鼻腔粘膜中有很高的沉积率, 因而对人体健康的影响是极大的. 研究表明大气中细和超细颗粒物与人群呼吸系统疾病和心血管疾病的发病率和死亡率密切相关^[3—6]. 但目前, 我们对细颗粒物的认识与实际生活中颗粒物对健康影响之间还存在着巨大的差距, 细颗粒物对人体健康影响的机制还不清楚.

吸入的细和超细颗粒容易沉积在鼻腔粘膜、支气管和肺泡区域^[7], 并通过血液循环进入其他组织器官中, 显示出与粗颗粒不同的转运机制^[8, 9]. 研究表明沉积在鼻腔粘膜的外源物质有可能沿嗅神经进入中枢神经系统 (CNS), 其进脑的几率与颗粒物的化学组成、存在状态和物理尺寸等因素有关^[10]. 目前研究证实可通过嗅觉感受器神经元进入嗅球和脑组织的金属离子有 Cd, Co, Hg, Mn, Ni 及胶体金等^[11, 12]. Breneman 等^[13]和 Dorman 等^[14]发现由鼻腔滴入或吸入的 MnCl₂ (2.51 μ m) 和 MnSO₄ 溶胶 (1.08 μ m) 能够经嗅球路径进脑. 但 Rao 等^[15]发现与锰化学性质极为相似的铁化合物 (FeSO₄ 溶胶, 2.99 μ m) 却不能经嗅球进入脑组织.

* 国家自然科学基金重大项目(10490180), 国家科技部 973 预研项目(2001CCA03800)和中国科学院知识创新重大项目(KJXC2-N10)资助

1) E-mail: fengwy@mail.ihep.ac.cn

在 20 世纪 70 年代, De Lorenzo 等^[16]用透射电镜成像观察了 50nm 的胶体金颗粒沿嗅神经迁移的整个过程, 证明了难溶的超细颗粒与可溶的金属化合物一样也存在由嗅神经进入 CNS 的途径. 2002 年, Fechter 等^[17]评价了不同尺寸的 MnO_2 颗粒沿嗅神经的迁移, 发现小颗粒 MnO_2 (1.3 μm) 比大颗粒 (18 μm) 更容易被嗅神经吸收并迁移到嗅球内部. 2004 年, Oberdörster, G 等^[18]研究了吸入的超细碳颗粒 (35nm) 在脑中的迁移; Oberdörster, E^[19]报道了新型人工纳米材料富勒稀可经嗅球进入水生生物脑中并可引起脑中氧化性损伤. 这些研究结果极大地激发了人们对环境中不同的细和超细颗粒物进脑机制的研究.

细和超细 Fe_2O_3 颗粒物粉体在建筑材料、光学、医药、半导体、信息通讯、军事等领域有广泛的应用. 因此, 本文利用具有微区扫描分析特点的同时同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 方法, 重点分析了由鼻腔滴入细 Fe_2O_3 颗粒后, Fe 能否进入嗅球组织及 Fe 在嗅球中的微区分布, 以研究颗粒物从嗅球进脑的途径和可能的机制, 同时还研究了 Fe 进入嗅球后, 对 Ca, Mn, Zn, Cu 等微量元素在嗅球分布的影响.

2 材料和方法

2.1 颗粒悬浮液的制备

细颗粒三氧化二铁 (Fe_2O_3) 粉购于成都世佳微尔有限公司. 氧化铁粉分散在 1% 的羧甲基纤维素钠溶液中, 配成浓度为 40mg/mL 的悬浮液, 超声分散 5 分钟, 分散体系中 Fe_2O_3 的粒径为 60—200nm (小角散射图略).

2.2 实验动物设计

CD-ICR 小鼠购于北京大学医学部实验动物中心, 体重 20—22g. 动物室温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 5\%$, 12h 光照 (8:00~20:00), 自由摄食、饮水, 环境适应 1 星期后用于实验. 实验组 3 只小鼠按 40mg/kg 剂量单侧鼻孔 (右) 滴入上述 Fe_2O_3 悬浮液, 对照组用同样方法滴入 1% 羧甲基纤维素钠溶液. Fe_2O_3 悬浮液滴入前, 涡旋 1 分钟以防止颗粒团聚.

2.3 嗅球切片的制备

小鼠滴鼻后 2 个星期被处死, 取嗅球于干冰-酒精-正己烷的溶液中速冻, 于冰冻切片机上切成 80 μm 的薄片, 固定于聚碳酸酯膜上, 自然晾干, 待同步辐射 X 射线荧光分析用.

2.4 同步辐射 X 射线荧光法分析小鼠嗅球切片中的元素的浓度和分布

X 射线荧光测量在中国科学院高能物理研究所同步辐射站上进行. 储存环中电子束流的能量为 2.5 GeV, 光斑的尺寸为 $60 \times 80 \mu\text{m}^2$, 一个 X 荧光谱的采集时间为 80s. 对小鼠右半边嗅球进行面扫描, 扫描步长为 X 轴 (150 μm), Y 轴 (200 μm).

元素的峰面积用康普顿散射进行质量归一, 根据样品对康普顿散射强度与他的质量成正比, 定量分析样品中微量元素的含量^[20, 21], 作出元素在嗅球切片中分布图. 对嗅球切片各层中的元素含量进行统计分析, 比较两组嗅球切片各层中元素含量的变化.

3 结果与讨论

嗅觉系统是一条可以避开血脑屏障直接将脑和外周环境相联系的通道. 从嗅球发出的神经联络纤维可到达脑内各个区域. 大鼠嗅球分层自外向内分为 6 层: 嗅神经纤维层 (ON)、突触小球层 (Gl)、外丛层 (EPI)、僧帽细胞层 (Mi)、内丛层 (IPI) 和嗅束神经纤维层 (lo).

图 1 为 Fe, Ca, Zn, Cu 在对照组和实验组小鼠嗅球切片中的含量分布. 从图 1(A) 可以看出, 对照组嗅球中, Fe 在前嗅核外部 (AOE) 和颗粒细胞层 (GrA) 中含量较高. 而在实验组中, Fe 除在 AOE 和 GrA 层含量较高外, 在嗅神经纤维层 (ON)、突触小球层 (Gl) 和外丛层 (EPI) 中 Fe 含量也明显升高. 这表明吸入的 Fe_2O_3 细颗粒进入了嗅球. 图 2 为元素在嗅球各层中含量的比较. 图 2(A) 的结果表明, 实验组 ON、Gl 和 AOE 层中 Fe 的含量与对照组相比明显升高, 说明 Fe 经由嗅神经进入嗅球的小球层, 并沿小球层的次级嗅神经进入嗅球内部 AOE 区, 进而可以进入中枢神经系统. Tjälve 等报道由鼻腔滴入可溶性的金属化合物可沿初级嗅神经和次级嗅神经在脑中迁移^[22—24]. de Lorenzo^[16]用透射电镜成像观察到沉积在鼻腔粘膜的金颗粒 (50nm) 在细胞质中沿着嗅神经的嗅觉纤维顺行迁移至嗅球小球层僧帽细胞的尖树突中 (含有次级嗅神经).

目前已知的外源物质经鼻粘膜吸收入脑主要有 3 条通路: 嗅神经通路、嗅粘膜上皮通路和血液循环通路. 外源物质均可通过前两条通路直接进脑. 而多数小分子是通过嗅粘膜上皮通路进脑, 此通路较嗅神经通路迅速^[24]. 小分子可经粘膜上皮嗅神经受体细胞以外的其他区域借助胞饮或扩散作用进入支持细胞和

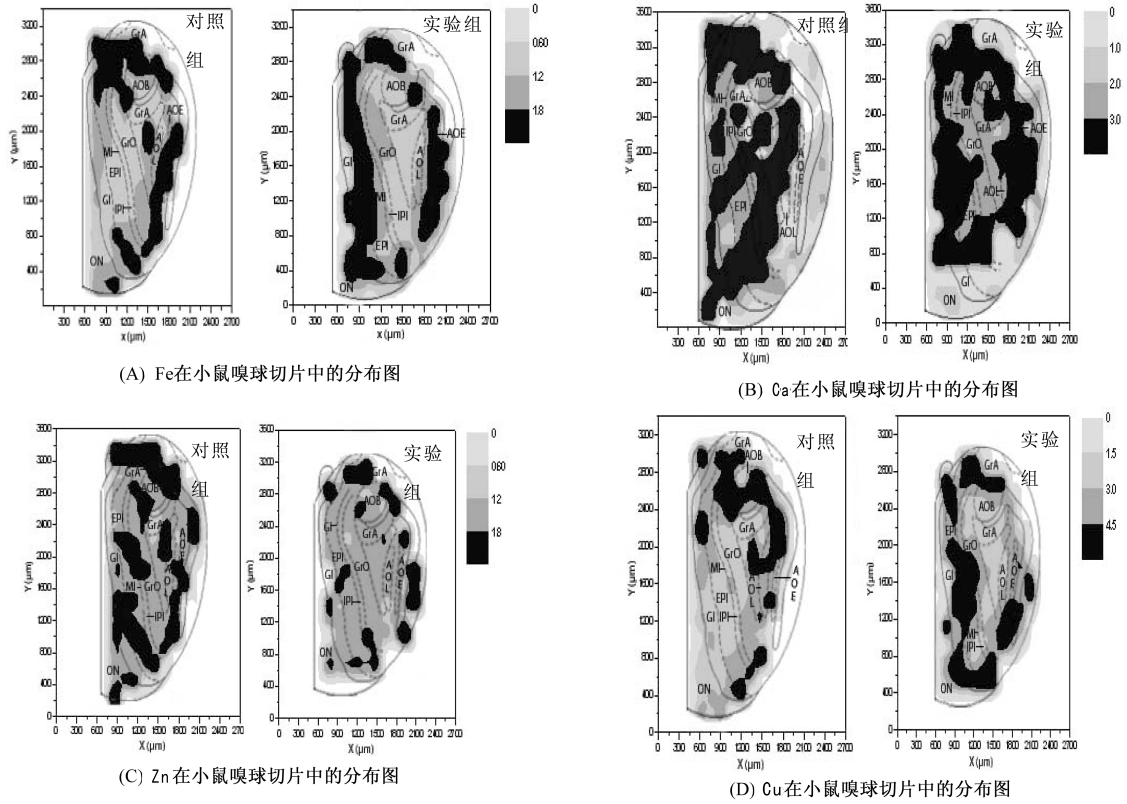


图 1 Fe, Ca, Zn, Cu 在实验组和对照组嗅球切片中的分布

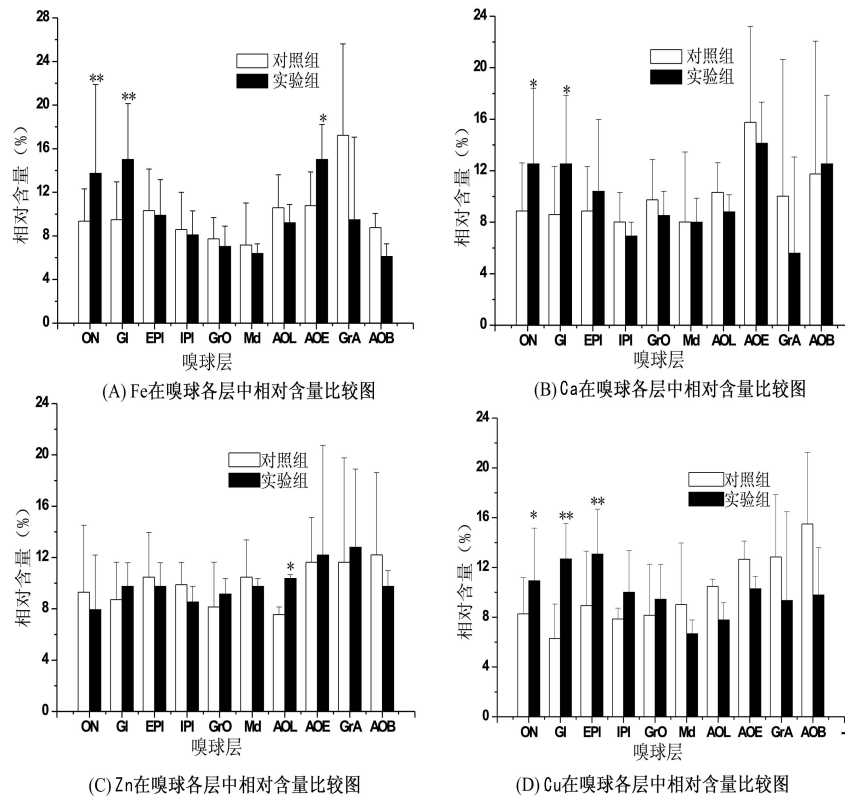


图 2 Fe, Ca, Zn, Cu 在嗅球各层中相对含量的比较(* $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

腺细胞. 也可穿过细胞间隙进入细胞间液. 嗅神经通路是物质被神经元轴突末梢摄取, 再经轴浆流动在嗅神经元细胞体内被转运至嗅球, 最后到达所谓的嗅脑 (rhinencephalon, 包括嗅球及前脑区). 一些金属离子(如镉, 镍等)已被证明是通过嗅神经通路进脑的^[23].

到目前为止, 颗粒物经鼻粘膜或呼吸暴露进脑的机制并不清楚. 一般认为影响物质经鼻腔吸入脑的主要因素有化合物的分子量、颗粒物尺寸、脂溶性和分子解离度等. Rao 等^[15]证明 $^{59}\text{FeSO}_4$ 溶胶经大鼠鼻腔吸入不能进入嗅球中, 此结果与我们对 Fe_2O_3 细颗粒入脑的研究结果并不一致, 我们推测这可能与二者在嗅神经中不同的迁移机制有关. 以前的研究表明金属硫酸盐和金属氧化物经嗅球进脑的机制是很复杂的^[10], 因此对细和超细颗粒物特别是经呼吸暴露进脑的机制应作进一步的研究.

分析图 1(B)—(D) 发现, 铁的吸入暴露, 也导致了一些微量元素在嗅球中的含量分布发生了变化. 表 1 列出了实验组和对照组嗅球切片中 Fe, Ca, Zn 和 Cu 的含量变化. 可以看到实验组 Fe 和 Ca 的浓度与对照组相比分别升高了 20% 和 12%; Zn 的浓度降低了 17%, 而 Cu 的浓度基本没有变化. 结合图 2(B)—(C) 的分析结果, 可以看到实验组中 Ca 的含量在 ON 和 Gl 层中与对照组相比显著升高. 实验组 Zn 的含量除在 AOL 层中与对照组相比显著升高以外, 在 ON, EPI, IPI 和

AOB 层中 Zn 的浓度均比对照组明显降低. 图 1(D) 和图 2(D) 的结果表明, 虽然实验组嗅球切片中 Cu 的含量与对照组相近, 但 Cu 在嗅球切片中的分布发生了明显改变, 对照组中 Cu 主要蓄积在 AOL, AOE, AOB 和 GrA 层, 实验组中 Cu 主要蓄积在嗅球 ON, Gl 和 EPI 层.

表 1 滴入细颗粒 Fe_2O_3 后实验组和对照组嗅球切片中各元素的浓度变化

元素	Fe	Ca (%)	Zn	Cu
实验组与对照组相比浓度的变化*	+20%	+12%	-17%	+3.5%

*: + 表示升高, - 表示降低.

上述实验结果表明, 经鼻吸入 Fe_2O_3 细颗粒, Fe 可以经由嗅神经通路进入中枢神经系统. 另一方面, 吸入的 Fe 进入嗅球中还引起了嗅球中一些必需微量元素的含量和分布发生了变化. 铁是大气颗粒物组分中主要的过渡金属元素, 随着纳米技术的产业化, 各种形式的含铁的细和超细物质已经以各种不同的途径进入我们的生活, 这些材料可以在生产和使用过程中通过呼吸暴露直接进入人体, 由于脑中铁水平的升高和许多神经退行性疾病有关^[25-28], 所以有必要深入研究细和超细颗粒通过呼吸暴露进脑的机制及其生物效应.

参考文献(References)

- Samet J M, Dominici F R, Curriero F C D et al. The New Eng. J. Med., 2000, **343**(24): 1742—1749
- Gauderman W J, Avol E, Gilliland F et al. The New Eng. J. Med., 2004, **351**(11): 1057—1067
- Wichmann H E, Spix C, Tuch T et al. Daily Mortality and Fine and Ultrafine Particles in Erfurt, Germany. Part I: Role of Particle Number and Particle Mass. Health Effects Institute Research Report No. 98, Boston, November, 2000, 1—86
- Pekkanen J, Peters A, Hoek G et al. Circulation, 2002, **106**: 933—938
- Klot V S, Wölke G, Tuch T et al. Eur. Respir J., 2002, **20**: 691—702
- Penttinen P, Timonen K L, Tiittanen P et al. Eur. Respir J., 2001, **17**(3): 428—435
- CHENG Y S, Yeh H C, Guilmette R A et al. Aerosol Sci. & Technol, 1996, **5**: 274—291
- Oberdörster G, Finkelstein J N, Johnston C et al. Res. Rep. Health Eff. Inst., 2000, **96**: 5—74
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V et al. J. Tox. & Environ Health, 2002, **65**(20): 1531—1543
- Dorman D C, Struve M F, James R A et al. Toxicol Appl. Pharmacol, 2001, **170**(2): 79—87
- Persson E, Henriksson J, Tallkvist J et al. Toxicology, 2003, **191**: 97—108
- Sunderman F W Jr. Ann. Clin. & Lab. Sci., 2001, **31**(1): 3—24
- Brenneman K A, Wong B A, Buccellato M A et al. Toxicol Appl. Phar., 2000, **169**: 238—248
- Dorman D C, McManus B E, Parkinson C U et al. Inhal Toxicol, 2004, **16**(6-7): 481—488
- Rao D B, Wong B A, McManus B E et al. Toxicol Appl. Pharmacol, 2003, **193**(1): 116-26
- de Lorenzo A J D. The Olfactory Neuron and the Blood-Brain Barrier. In: Taste and Smell in Vertebrates (CIBA Foundation Symposium Series). Wolstenholme G E W, Knight J, eds. J&A Churchill, Publishers, 1970, 151—176
- Fechter L D, John D L, Lynch R A. Neurotoxicology, 2002, **23**: 177—183
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V et al. Inhal Toxicol, 2004, **16** (6-7): 437—445
- Oberdörster E. Environ Health Perspect, 2004, **112**(10): 1058—1062
- ZHANG Z Y et al. HEP& NP. 2003,**27**: 114—117(in Chinese)
(张智勇等. 高能物理与核物理, 2003, **27**: 114—117)

- 21 LIU Nian-Qing, ZHANG Fang, WANG Xue-Fei et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, **B59**: 255—260
- 22 Tjälve H, Mejare C, Borg-Neczak K. *Pharmacol. Toxicol.*, 1995, **77**: 23—31
- 23 Tjälve H, Henriksson J, Tallkvist J et al. *Pharmacol Toxicol.*, 1996, **79**: 347—356
- 24 Tjälve H, Henriksson J. *Neurotoxicology*, 1999, **20**: 181—195
- 25 Gulyaev A E, Gelperina S E, Skidan I N et al. *Pharm Res.*, 1999, **16**(10): 1564—1569
- 26 Smith M A, Harris P L, Sayre L M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**: 9866—9868
- 27 SUN A Y, CHEN Y M. *J. Biomed Sci.*, 1998, **5**: 401—414
- 28 QIAN Zhong-Ming. *Prog. in Phys. Sci.*, 2002, **33**(3): 197—203(in Chinese)
(钱钟明. *生理科学进展*, 2002, **33**(3): 197—203)

Microtranslocation of Trace Element in the Olfactory Bulb of Mice after Intranasal Instillation of Fine Oxide Particle by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence*

WANG Bing^{1,2} FENG Wei-Yue^{1;1)} WANG Meng^{1,2} SHI Jun-Wen^{1,2} ZHANG Fang¹
OUYANG Hong¹ ZHAO Yu-Liang¹ CHAI Zhi-Fang¹ HUANG Yu-Ying³ XIE Ya-Ning³

1 (Laboratory for Bio-Environmental Health Sciences of Nanoscale Materials and Key Laboratory of Nuclear Analytical Techniques, Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

2 (Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

3 (Beijing Synchrotron Radiation Laboratory, Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

Abstract The contents and micro distribution of iron and other trace elements in the olfactory bulb after intranasal instillation were measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis (SRXRF). The mice were intranasally instilled of fine iron oxide particles (60—200nm) at a dose of 40mg/kg body weight. Two weeks later, the content of iron in the olfactory bulb increased 20% compared with the control. The elevated iron was predominately concerned in the olfactory nerve (ON), granular layer (Gl) and anterior olfactory nucleus, external part (AOE), which indicated that fine iron oxide was transported to Gl via primary olfactory nerve and further translocated in AOE via secondary olfactory nerve. Moreover, in the experiment group, the levels of Ca increased 12% and Zn decreased 17%. Similarly to Fe, the higher Ca concentration was dominantly accumulated in the ON and Gl layers as well. Although the average Cu content in the control and experimental group was similar, the distribution of Cu was obviously changed due to the exposure of fine Fe₂O₃ particles. In the control, Cu was primarily concerned in anterior olfactory nucleus, lateral part (AOL), AOE, accessory olfactory bulb (AOB) and granule cell layer of the accessory olfactory bulb (GrA), while the Cu content in the experimental group was significantly higher in the ON, Gl and EPI layers. In conclusion, the changes of Fe, Ca, Zn, Cu levels must be, to some extent, correlate with the oxidative stress and neurodegenerative diseases.

Key words fine particle, iron oxide, SRXRF, olfactory bulb, microtranslocation of trace element

*Supported by Major Program of NSFC (10490180), Ministry of Science and Technology of China Research Pre-973 Program (2001CCA03800) and Chinese Academy of Sciences Knowledge Innovation Project of CAS(KJ CX-N10)

1) E-mail: fengwy@mail.ihep.ac.cn