

# 孕哺期染铅对幼鼠脑微量元素、SOD 及细胞凋亡的影响

逯晓波, 蔡原, 金亚平, 安利, 李北利

(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:** 目的 探讨孕哺期铅暴露所致仔代发育期的神经毒性机制。方法 母鼠从妊娠起始至仔鼠出生后 7d 染铅, 原子吸收石墨炉法及火焰法测定出生后 7d 仔鼠的血、脑铅及脑组织微量元素铜、锌含量; 同时测定脑组织脂质过氧化水平 (LPO) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 另外应用原位末端标记 TUNEL 法测定脑海马区及附近皮质细胞凋亡数量的改变。结果 染铅使仔鼠血铅、脑铅水平升高, 脑微量元素铜有下降趋势, 同时脑 LPO 水平升高, SOD 活性下降, 且海马区附近皮质细胞凋亡数量增加, 尤其体现在高剂量染铅组。结论 铅的发育神经毒性与中枢神经系统铜等微量元素的改变、抗氧化能力下降及由此所致的细胞凋亡数量增加有关。

**关键词:** 铅; 微量元素; 超氧化物歧化酶; 细胞凋亡; 神经发育毒性

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)05-0260-03

## Effect of lead exposure during pregnancy and lactation on trace element level,

## SOD activity and apoptosis in brain of baby-rats

LU Xiao-bo, CAI Yuan, JIN Ya-ping, AN Li, LI Bei-li

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract Objective** To study the mechanism of neurotoxic effect of lead exposure during pregnancy and lactation on baby-rat.

**Method** The female rats were administrated with lead from pregnancy to 7th day after delivery, measuring the Pb concentration in blood and Pb, Cu, Zn concentrations in brain of the baby-rats by atomic absorption spectrophotometry, the LPO level and SOD activity in brain were also measured. In addition, meanwhile, the number of apoptotic cells at hippocampus and nearby cortex were also detected by in situ labeling method (TUNEL). **Result** The results showed that the levels of blood lead and brain lead were increased, the brain Cu concentration seemed to present some decrease trend with the rise of lead level, and there were increase of LPO level and decrease of SOD activity in brains of the baby-rats as well; meanwhile the apoptotic cell number also showed some increase in the hippocampus and its nearby cortex especially in the high dosage group. **Conclusion** The toxicity of lead on neuron development might related to the change of trace element concentration, reduction of antioxidation ability and increasing apoptosis in brain.

**Key words:** Lead; Trace elements; SOD; Apoptosis; Developmental toxicity on nervous system

重金属铅是环境中广泛存在的一种神经毒物, 能引起中枢及周围神经系统功能的改变。铅对发育中的神经系统的损伤作用更加敏感<sup>[1]</sup>。流行病学研究和动物实验证实发育期铅暴露可引起认知能力损害、行为改变及神经功能障碍, 且这种损害会持续到成年阶段, 造成对中枢神经系统不可逆转的损伤。铅对神经系统的毒性作用机制尚不完全清楚, 本研究通过大鼠孕哺期不同剂量染铅获得的幼鼠染铅模型, 观察了在幼鼠出生后 7 d 血铅及脑铅含量, 同时检测脑组织中铜、锌含量, SOD 活性改变及对海马及其附近皮质的细胞凋亡状态的影响, 从而进一步探讨铅的神经毒性作用机制。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2005-03-28; 修回日期: 2005-06-17

作者简介: 逯晓波 (1969-), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向: 重金属毒理与肿瘤流行病学。

### 1.1 动物分组

成年 Wistar 大鼠, 分笼饲养 7 d, 按雌雄比 2:1 合笼, 以次日凌晨在排泄物托盘中发现阴栓或阴道分泌物镜检有精子者定为已受孕者, 并记为妊娠 0 d, 随机将受孕鼠分为 4 组: (1) 对照组 (饮蒸馏水); (2) 实验 1 组 (饮含 0.05% 醋酸铅水); (3) 实验 2 组 (饮含 0.1% 醋酸铅水); (4) 实验 3 组 (饮含 0.2% 醋酸铅水); 每隔 3 d 对孕鼠称重一次。

### 1.2 染毒

将醋酸铅溶于蒸馏水中, 实验组从受孕 0 d 起饮用含铅水, 对照组从受孕 0 d 起饮用蒸馏水; 直至仔鼠生后第 7 天, 母鼠经饮水染铅而幼鼠则通过吮吸母乳而接触铅。动物室温度 18~23℃, 相对湿度为 45%~55%, 自由饮水、摄食。

### 1.3 取材

于仔鼠出生后 7 d, 断头采血, 取全脑, 称重,

取0.2~0.3 g脑组织用于铅、铜、锌含量的测定, 剩余部分制成组织匀浆分别测定LPO含量、SOD活力。此外每组随机抽取2~3只仔鼠, 打开胸腔, 暴露心脏, 左心室进针, 打开右心耳, 经生理盐水全身灌注, 待将血液基本冲净后, 参照大鼠脑立体定位图谱, 取海马及其周围脑区再固定于多聚甲醛溶液, 用于细胞凋亡原位标记检测, 形态学检查。

#### 1.4 铅、铜、锌含量测定

1.4.1 器材的无铅化处理<sup>[7]</sup> 将取血和测血铅、脑铅过程中所用的离心管、加样器、塑料管、进样管等置于20%硝酸液浸泡48 h, 用去离子水洗净, 干燥待用。

1.4.2 血铅测定 取肝素抗凝血0.1 ml, 加入稀释液1.0 ml, 震荡、混匀, 采用原子吸收分光光度计石墨炉法测定。

1.4.3 脑铅、铜、锌含量测定 将精确称重的脑组织放入聚四氟乙烯消化罐中, 加入消化液, 置于不锈钢外套中, 120℃消化2 h, 过夜冷却, 脑铅采用原子吸收石墨炉分光光度法测定, 铜、锌用原子吸收火焰分光光度法测定。

1.5 脑组织脂质过氧化物(LPO)生成量、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 LPO测定采用硫代巴比妥酸法, SOD测定采用黄嘌呤氧化酶法。

#### 1.6 海马及其周围皮质凋亡细胞形态观察及记数——原位细胞凋亡标记技术(Tunel)

石蜡包埋, 常规制成4 μm切片, 检测前切片常规脱蜡入水, 蛋白酶消化, 采用北京华美公司细胞凋亡原位标记试剂盒, 按其说明书基本操作如下: 滴加标记缓冲液, 将末端脱氧核糖核酸转移酶TdT、含有生物素标记的亲合素Biotin-11-dUTP、标记缓冲液以2:2:16的比例滴加样品片, 4℃湿盒过夜; 用2×SSC浸泡20 min; 用新鲜配置的0.3%过氧化氢-甲醇液浸泡阻止内源性过氧化15 min; 于样品片上滴加亲和素辣根过氧化物酶(Avidin-HRP)工作液50 μl, 37℃湿盒中反应30 min。DAB显色、苏木精轻度复染, 脱水、透明、常规树脂封片。以细胞核中发现棕黄颗粒判定为TUNEL阳性细胞。在显微镜400倍视野下计数海马及其周围皮质TUNEL阳性细胞, 细胞记数采用5点法(切片上、中、下、左、右5点随机选择视野)。

#### 1.7 质量控制

血铅的测定按美国疾病控制中心提供的参考血样作为质控, 对其他指标的测定分析过程及分析结果也

进行严格的质量控制。

#### 1.8 数据处理

用SPSS软件进行实验数据整理及分析, 主要进行方差分析及两两比较 $q$ 检验。

### 2 结果

#### 2.1 各组仔鼠血铅, 脑铅、铜、锌含量比较

表1可见, 各实验组仔鼠血铅、脑铅均显著高于对照组, 随着染铅剂量的增加, 血铅与脑铅含量也随之增加。实验组与对照组相比, 脑组织铜含量有下降趋势, 0.1%、0.2%醋酸铅组与对照组相比, 差异有统计学意义。

表1 各组仔鼠血铅, 脑铅、铜、锌含量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

组别	血铅( $\mu\text{mol/L}$ )	脑铅( $\mu\text{g/g}$ )	脑Cu( $\text{mg/g}$ )	脑Zn( $\text{mg/g}$ )
对照组	0.26±0.09	0.06±0.02	0.047±0.008	0.399±0.093
0.05%醋酸铅组	1.27±0.34*	0.23±0.07**	0.043±0.003	0.323±0.020
0.1%醋酸铅组	2.02±0.79**	0.49±0.26**	0.034±0.011*	0.349±0.120
0.2%醋酸铅组	3.34±0.96**	0.59±0.15**	0.035±0.014*	0.367±0.092

与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 下同。

#### 2.2 各组仔鼠脑组织LPO水平及SOD活性的改变

由表2可见, 各实验组与对照组相比, 脑组织中LPO含量显著升高; 0.1%、0.2%醋酸铅组LPO含量、SOD活力与对照组相比较, 差异均有显著性( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

表2 仔鼠脑组织LPO水平及SOD活性测定结果

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

组别	LPO( $\text{nmol/mgHb}$ )	SOD( $\text{U/mgHb}$ )
对照组	22.02±9.90	31.17±8.91
0.05%醋酸铅组	29.38±5.25	30.66±2.75
0.1%醋酸铅组	33.77±8.33*	23.51±7.10*
0.2%醋酸铅组	33.86±9.71**	21.14±6.3**

#### 2.3 染铅对幼鼠海马及附近皮质细胞凋亡的影响

由表3可见, 随着染铅剂量的增加, 幼鼠脑海马区及附近皮质区细胞凋亡数量增加。0.2%醋酸铅组与对照组相比, 其海马附近皮质区TUNEL阳性细胞核数有明显升高。

表3 出生后7d染铅对仔鼠海马及附近皮质细胞凋亡的影响

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	皮质	海马
对照组	17.44±3.32	7.78±1.78
0.05%醋酸铅组	18.09±4.20	7.66±3.35
0.1%醋酸铅组	20.00±4.94	7.50±2.01
0.2%醋酸铅组	21.41±4.03*	8.08±1.92

### 3 讨论

近年来, 环境中铅污染对儿童学习记忆能力的损伤及远期危害已经引起广泛关注。但铅的神经毒性机制并不完全清楚, 可能为多途径多因素相互作用的结果。有研究表明铅能促进活性氧自由基 (ROS) 的产生, 使脑组织处于氧化应激从而增强脂质过氧化过程<sup>[2]</sup>。超氧化物歧化酶 (SOD) 是机体能够清除超氧阴离子的酶, 该酶受到抑制, 必然造成超氧阴离子的堆积, 并可通过其他反应生成羟自由基等氧自由基产物。Hodgson 指出, 超氧阴离子和羟自由基是脂质过氧化过程的关键因素<sup>[2,3]</sup>。本研究发现, 脂质过氧化程度与 SOD 活力下降间存在平行直接的关系。在真核细胞中, 以存在于细胞浆的 Cu, Zn-SOD 为主要形式, 且活性最强<sup>[3]</sup>。Mylorie 认为 SOD 活力下降是由于铅所致的铜缺乏, 因为铜在这种酶的反应过程中起到催化作用<sup>[4]</sup>。本研究应用原子吸收火焰法测定仔鼠脑组织中铜、锌含量, 中、高剂量组与对照组相比, 铜含量有下降趋势。

大量研究表明, 在神经系统发育过程中, 细胞凋亡具有重要的生物学意义<sup>[5]</sup>。为适应发育进程的需要, 整个神经系统处于神经细胞的增殖和自然凋亡的动态平衡之中。蔡文琴等<sup>[6]</sup>应用 Tunel 法测定大鼠大脑半球皮层、海马、基底节区等脑区的神经细胞凋亡, 发现高峰期发生在出生后 7 d。Oberto 认为在中枢神经系统发育期, 铅导致的神经毒性作用是通过细胞凋亡来进行的。他们使用出生后 6~8 d 的新生大鼠小脑颗粒细胞在体外复制铅的神经毒作用模型, 结果发现 1 μmol/L 铅暴露不影响谷氨酸所致神经元细胞坏死, 但促进了细胞凋亡的发生<sup>[7]</sup>。另外, 可能

在氧化应激和细胞凋亡间存在一些联系。有报道认为可引起自由基增多的氟化物能明显引起体外培养软骨细胞及成骨细胞发生细胞凋亡, 而加入 SOD 后对细胞凋亡有拮抗作用<sup>[8]</sup>。在体内环境中, 铅能否诱导发育期神经元细胞的凋亡, 我们能检索到的国内外的报道甚少。本研究结果提示, 在出生 7 d 时, 高剂量染铅组仔鼠脑组织海马附近皮质区 TUNEL 阳性细胞核与对照组相比明显升高。染铅所致铜等微量元素含量下降造成 SOD 活力降低, 从而使 ROS 增加, 而 ROS 则可能是细胞凋亡的传递器。故铅的发育神经毒性机制与微量元素铜缺乏所致 SOD 酶活性下降, 和由此造成的自由基增加以及由 ROS 所介导的细胞凋亡间存在密切关系。本研究为铅神经毒性的自由基学说提供了一些佐证。

#### 参考文献:

[1] 张军. 发育期铅暴露的远期危害及其机制的研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1999, 12: 106.  
 [2] Adonayb VN. Lead intoxication; antioxidant defense and oxidative damage in rat brain [J]. Toxicology, 1999, 135: 77-85.  
 [3] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991. 216.  
 [4] Mylorie AA. SOD activity and other parameter [J]. Toxicol Applied Pharm 1985, 82: 375-392.  
 [5] Yuan J. Apoptosis in the nervous system [J]. Nature, 2000, 407: 802-813.  
 [6] 蔡文琴. 发育神经生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 221.  
 [7] Oberto A. Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons; pathological implications [J]. J Pharm Experi Thera, 1996, 279: 435-442.  
 [8] 桂枝枝, 王长松, 于艳妮, 等. 氟对软骨细胞与成骨细胞凋亡及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SOD、NO 的影响 [J]. 中国地方病杂志, 2004, 23: 108-112.

(上接 259 页)

[8] Lailey AF, Hill L, Lawston IW, et al. Protection by cysteine esters against chemically induced pulmonary edema [J]. Biochem Pharmacol 1991, 42 (suppl): 47-54.  
 [9] Hobbs MJ, Battenworth M, Cohen CM, et al. Structure-activity relationships of cysteine esters and their effects on thiol levels in rat lung in vitro [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45 (8): 1605-1612.  
 [10] Lailey AF, Upshall DG. Thiol levels in rat bronchio-alveolar lavage fluid after administration of cysteine esters [J]. Human Exp Toxicol, 1994, 13: 776-780.  
 [11] 赵建, 丁日高, 张宪成, 等. 四氢吡咯二硫代氨基甲酯对全氟异丁烯吸入性肺损伤的防治效果 [J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14 (6): 331-335.  
 [12] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-

protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent [J]. Anal Biochem, 1968, 25: 192-205.  
 [13] 张在兴, 祝学光, 才文彦, 等. 内源性一氧化氮对大鼠应激性胃粘膜损伤的保护作用 [J]. 北京医科大学学报, 1997, 29: 510-512.  
 [14] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27: 916-921.  
 [15] Jurina-Romet M, Abbott FS, Tang W, et al. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione 2 depleted rat hepatocytes [J]. Toxicology, 1996, 112: 69-85.  
 [16] Jaskot RH, Grose EC, Richards JH, et al. Effects of inhaled phosgene on rat lung antioxidant systems [J]. Fundam Appl Toxicol, 1991, 17: 666-674.