

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.006

硒对铅暴露致神经损伤的拮抗作用研究*

张旭慧^{1#} 官能成^{1#} 赵芳² 骆文静² 陈景元^{2△} 刘明朝^{2△}

(1 第四军医大学生物医学工程学学员队 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学军事预防医学系军队劳动与环境卫生学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究铅暴露诱导的神经毒性损伤作用,明确铅暴露引发神经毒性损伤的部分机制以及硒的保护作用。**方法:**通过哺乳期染铅及补充硒建立铅暴露动物模型;通过 TUNEL 实验确定铅暴露引发的神经损伤;通过 Western blot 实验检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3 水平确定铅暴露对凋亡途径的启动;并确证补硒在铅神经毒性作用下对机体的保护作用。**结果:**1. 哺乳期铅暴露能够引起仔鼠海马神经细胞凋亡的发生;2. 铅暴露能够诱导 Bax/Bcl-2 水平改变,激活 Caspase-3。3. 同时给予硒干预后,机体抗铅神经毒性能力显著增加。**结论:**1. 铅暴露能够诱导海马部位神经毒性损伤,损伤可能通过启动凋亡途径而发生,2. 补硒能够通过拮抗凋亡发生从而拮抗铅的神经毒性,产生保护作用。

关键词:铅暴露;SD 孕鼠;凋亡;海马神经元

中图分类号:R595.2;R135.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5625-04

The Effect of Selenium Supplementary on Lead Induced Neurotoxicity*

ZHANG Xu-hui^{1#}, GUAN Neng-cheng^{1#}, ZHAO Fang², LUO Wen-jing², CHEN Jing-yuan^{2△}, LIU Ming-chao^{2△}

(1 The Corps of Biomedical Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Occupational & Environmental Health, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of lead exposure on neurotoxicity, and to identify the mechanism of lead exposure on neurotoxicity and clear protection effect of selenium supplementary. **Methods:** Establish the lead exposure and selenium supplementary animal model by lactation lead exposure and supplementary with selenium. The damage caused by the lead on the hippocampal neurons were detected by in situ TUNEL assay. The activity of apoptosis-related proteins was detected by Western blot; The protective effect of selenium supplementary in lead neurotoxicity was also confirmed. **Results:** 1. Lactating lead exposure could induce hippocampal neuronal apoptosis; 2. Lead exposure could alter the expression of apoptosis-related proteins such as Bax, Bcl-2 and Caspase-3. 3. Selenium supplementary could alleviate lead neurotoxicity. **Conclusion:** 1. Lead exposure could induce hippocampal neuronal injury and this injury may trigger by apoptosis pathway; 2. Selenium supplementary may resist lead induced apoptosis thereby protect neurons from lead neurotoxicity.

Key words: Lead exposure; Pregnant SD rats; Apoptosis; Hippocampal neurons

Chinese Library Classification(CLC): R595.2; R135.11 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)29-5625-04

前言

铅作为一种工业原料被人类社会广泛使用,我国是铅开采大国,同时也是铅消费大国(2011 年 12 月份我国铅产量占世界总产量的 47.63%),随着工业的发展,人类活动的扩张,铅在人类生活环境中及在自然界中人类足迹到达的地方的分布越来越广泛、含量越来越高。而作为一种人类认识最为古远的毒物之一,铅对人体各部位、各器官均能造成损伤^[1,2]。铅对人体各组织系统的影响中,神经系统的受累最严重^[3]。中枢神经系统是铅毒性作用最为敏感的靶器官之一,长期接触铅可引发学习

记忆等功能的不可逆损害^[4]。但是铅暴露与机体损伤的时空关系及其确切机制尚未完全阐明。为进一步研究铅暴露的损伤作用及其损伤的机制,以及硒对铅的拮抗作用,本研究以哺乳期 SD 仔鼠为研究对象,采用哺乳期染铅,并给予硒进行干预,来研究铅暴露引起机体损伤的可能机制及硒的保护作用,进一步为铅神经损伤的机制及其预防提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 孕鼠(购于第四军医大学实验动物中心)。

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81001233)

作者简介:张旭慧(1991-),女,本科生,主要研究方向:环境神经毒理,E-mail: 1552035754@qq.com

官能成(1991-),男,生物医学工程专业本科生,主要研究方向:环境神经毒理,E-mail: 749915312@qq.com

为共同第一作者

△ 通讯作者:陈景元,E-mail: jy_chen @fmmu.edu.cn;刘明朝,E-mail: lmclmc@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-26 接受日期:2013-12-22)

1.1.2 主要试剂 醋酸铅、亚硒酸钠购于 SIGMA 公司(USA); In situ TUNEL 试剂盒购于 Roche 公司(Germany)。DAPI 荧光染料购于碧云天生物公司; 抗大鼠 Bax、Bcl-2、Caspase-3 等一抗及相应二抗均购于 Millipore(USA)公司。

1.1.3 主要仪器 凝胶成像分析仪(美国 SYNGENE 公司); 激光共聚焦显微镜(Olympus 公司); 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); -85℃ 超低温冰箱(美国 NuAire 公司); SIM-F140 制冰机(日本三洋公司); 超声波细胞/组织粉碎机(美国 Sonics 公司); Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 5415D 小型高速离心机(Eppendorf 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 铅暴露及补硒动物模型建立 选取孕 18 天 SD 母鼠, 随机分为对照组, 染铅组, 染铅补硒组; 常规饮食适应 3 天, 产仔后, 各组按前述分组给予不同组分的饮水: 对照组饮用去离子水; 染铅组饮用含醋酸铅的去离子水, 染铅剂量为 100 ppm^[5]; 染铅补硒组饮用含醋酸铅及亚硒酸钠的去离子水, 染铅剂量为 100 ppm, 亚硒酸钠含量为 0.2 ppm^[6]。暴露持续时间为整个哺乳期(21 d)。

1.2.2 组织样品提取 染铅结束后(22 d), 部分仔鼠麻醉后处死, 冰上取脑组织, 分离海马, 称重, 剪碎, 加裂解液于冰上裂解 30 min 后以超声粉碎机破碎细胞, 15000 rpm, 4℃ 离心 15 min, 取上清, 蛋白定量后, 以上样缓冲液及裂解液调节各组间蛋白浓度一致, 100℃ 5 min 后置入 -85℃ 超低温冰箱备用。另一部分动物麻醉状态下以 0.9% 生理盐水经左心室冲洗, 4% 多聚甲醛快速冲洗(150 mL)及慢速滴灌(250 mL)。灌注完成后于冰上取完整脑组织, 置入 10%, 20%, 30% 蔗糖溶液梯度脱水后以冰冻切片行连续切片(20 μm)置入 -85℃ 超低温冰箱备用。

1.2.3 原位凋亡检测 (In situ TUNEL assay) 参照 TUNEL 原位检测法检测海马神经元损伤, 组织切片复温后以 PBS 洗涤 5 min/3 次; 4% 多聚甲醛固定细胞 5-10 min; 0.1% Triton X-100 透化 15 min; PBS 漂洗 5 min/3 次; 1% BSA 封闭 30 min; 为阴性对照加 100 μL 标记液(管 2); 酶反应液(管 1)与标记液按 1:9 混合; 吸收多余液体, 使样品周围略干; 每样加混合反应液 30 μL 左右, 37℃ 饱和湿度下避光孵育 60 min; PBS 洗 5 min×3 次; 加入核染料 DAPI, 室温孵育 15 min; PBS 洗 5 min×3 次; 抗萃灭封片剂封片, 激光共聚焦下观察记录实验结果。

1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western blot 检测

测蛋白表达 配制 12% 或 10% 的分离胶和 5% 的积层胶; 每孔上样 20 μL。电泳 80 V/30 min, 120 V/90 min 后, 250 mA/90 min 将凝胶中蛋白转移至 NC 膜; 以 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加一抗, 于 4℃ 过夜; TBST 洗膜 5 min/3 次; 加相应二抗, 37℃ 孵育 1.5 h; 洗膜 15 min/3 次; 滴加化学荧光试剂, 在暗室中用凝胶成像分析仪扫描各免疫印迹条带灰度值并进行分析。

1.3 数据处理

实验数据以均数±标准差 (mean ± standard deviation) 表示。应用 ANOVA 检验进行样本均数间的差异性比较, 数据由 SPSS16.0 软件统计处理, P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 铅暴露对仔鼠大脑海马部位神经细胞凋亡的影响

与对照组相比, 哺乳期铅暴露后, 仔鼠大脑海马部位凋亡细胞数目呈显著性增高。阳性细胞数为 44.34±8.41, 对照组为 15.36±3.70, 两组之间对比有显著性差异 (P < 0.05)。

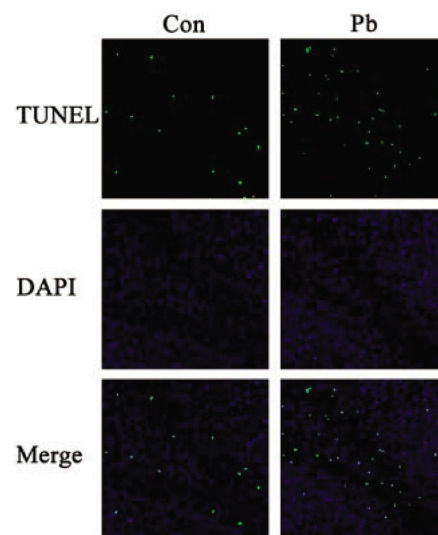


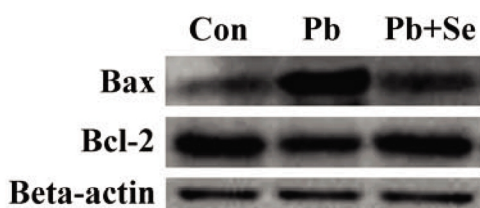
图 1 哺乳期铅暴露对仔鼠大脑海马区域神经细胞凋亡的影响

Fig.1 The effect of lactating lead exposure on SD rat pups hippocampal neuronal apoptosis

2.2 铅暴露对仔鼠大脑海马部位凋亡相关蛋白表达的影响及硒的拮抗作用

与对照组相比, 哺乳期铅暴露后, 仔鼠大脑海马区域 Bax

A



B

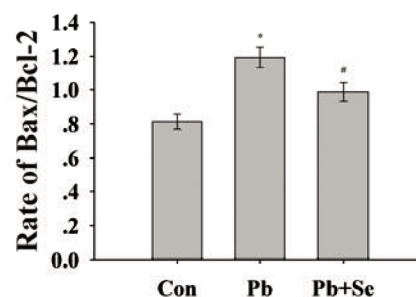


图 2 哺乳期铅暴露及补硒对仔鼠大脑海马区域凋亡相关蛋白表达的影响。* vs Con P < 0.05. # vs Pb P < 0.05

Fig.2 The effect of lactating lead exposure and Se supplementary on SD rat pups hippocampal apoptosis-related proteins expression. * vs Con P < 0.05. # vs Pb P < 0.05

表达水平呈增高趋势,而 Bcl-2 表达水平呈降低趋势,染铅组 Bax/Bcl-2 比值显著高于对照组($P < 0.05$);此外,与对照组相比,

染铅组 Caspase-3 蛋白的表达水平也呈增高趋势($P < 0.05$)。哺乳期铅暴露并予以硒拮抗后,染铅补硒组 Bax/Bcl-2 比值显著低

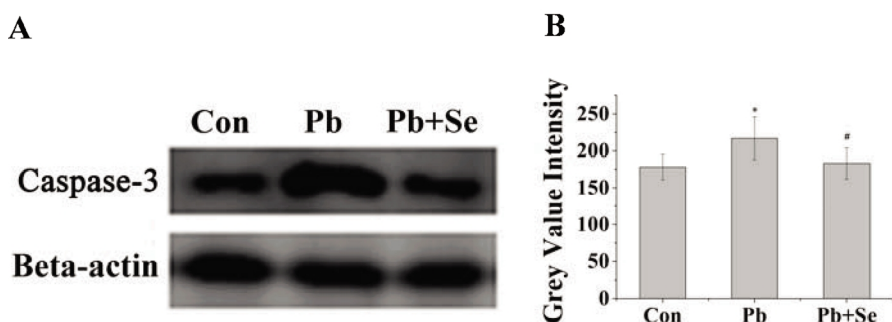


图3 哺乳期铅暴露及补硒对仔鼠大脑海马区域 caspase-3 活性的影响。* vs Con $P < 0.05$. # vs Pb $P < 0.05$

Fig.3 The effect of lactating lead exposure and Se supplementary on SD rat pups hippocampal caspase-3 activity. * vs Con $P < 0.05$. # vs Pb $P < 0.05$

于染铅组($P < 0.05$);而与染铅组相比,染铅补硒组 Caspase-3 蛋白的表达水平也呈降低趋势($P < 0.05$)。

2.3 补硒对铅致仔鼠大脑海马部位神经细胞凋亡的影响

哺乳期铅暴露可以导致仔鼠大脑海马部位神经细胞出现显著性的凋亡,而凋亡相关蛋白检测结果显示,哺乳期铅暴露可致仔鼠凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比值显著升高,并促使 Cas-

pase-3 蛋白的表达水平增高;而在染铅合并补硒组,硒能够有效地拮抗铅所导致的凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的变化及 Caspase-3 的蛋白表达。在染铅合并补硒后,仔鼠大脑海马神经细胞的凋亡数目显著低于染铅组,染铅组海马部位凋亡阳性细胞数为 47.26 ± 11.03 ,染铅补硒组为 21.53 ± 6.15 ,两组之间比较有显著差异($P < 0.05$)。

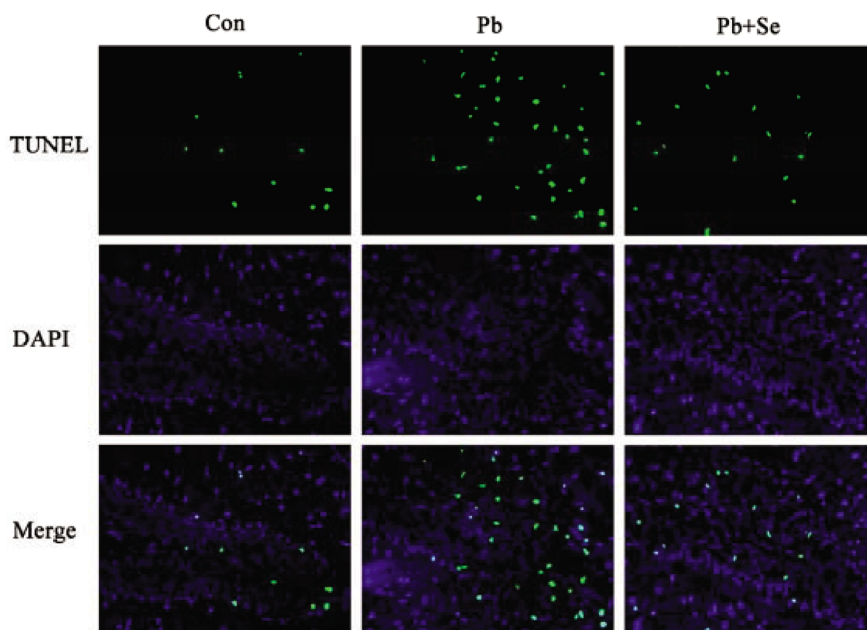


图4 哺乳期铅暴露及补硒对仔鼠大脑海马区域神经细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of lactating lead exposure and Se supplementary on SD rat pups hippocampal neuronal apoptosis

3 讨论

本实验检测了哺乳期铅暴露对 SD 仔鼠大脑海马部位神经细胞凋亡水平的影响,结果显示哺乳期铅暴露可导致 SD 仔鼠大脑海马区域神经细胞凋亡水平增高,进一步研究结果显示铅暴露可导致仔鼠大脑海马部位 Bax/Bcl-2 比值增高,Caspase-3 蛋白表达水平升高。而在哺乳期染铅的同时补硒,可以拮抗上述凋亡相关蛋白的变化,并缓解仔鼠大脑海马部位神经细胞的凋亡发生。

细胞凋亡是机体维持自身稳定的一种基本生理机制,是有

许多基因产物及细胞因子参与的一种程序性死亡^[7]。通过细胞凋亡途径,机体可消除损伤、衰老与突变的细胞来维持自身的内环境稳定和各种器官及系统的正常功能^[8]。本实验中仔鼠在哺乳期接受铅暴露后,检测结果显示,仔鼠大脑海马部位出现较对照组更显著的细胞凋亡。因此可以证实,哺乳期铅暴露,即铅通过乳汁暴露于仔鼠,可诱导仔鼠大脑损伤,尤其是在海马区域。

研究表明,所有动物细胞都具有类似的凋亡机制,Caspase 家族在细胞凋亡的分子机制网络中居核心地位,这种凋亡方式被称为 Caspase 依赖性的细胞凋亡。Caspase 活化是细胞凋亡

执行阶段的中心环节,Caspase 的家族成员 Caspase-3 被认为是这一家族中的关键蛋白酶,活化的 Caspase-3 可作用于其他的一些 Caspase 家族成员并降解凋亡细胞中的某些成分。实验证明,在凋亡发生前抑制 Caspase-3 的活性,可有效的拮抗凋亡的发生^[9]。另外,细胞凋亡同时还可能受到多种相关基因的调节,Bcl-2 是研究最早的与凋亡相关的基因,Bcl-2 基因家族分布在线粒体外膜等处,家族成员包括细胞凋亡抑制基因如 Bcl-2, Bcl-xL 等;以及细胞凋亡促进基因如 Bax, Bak 等。Bcl-2 和 Bax 的蛋白水平高低与凋亡调控过程直接相关,Bax 增高可促进细胞凋亡,而 Bcl-2 增高则抑制细胞凋亡。因此 Bcl-2 和 Bax 被认为是抑制和促进细胞凋亡最重要的两个基因^[10]。本实验也检测了凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达水平。检测结果显示与对照组相比,仔鼠海马区域脑组织中 Bcl-2/Bax 比值显著升高。同时我们也检测了仔鼠海马区域脑组织中 Caspase-3 的活性,结果显示,与对照组相比,Caspase-3 的活性也显著升高。提示铅通过乳汁暴露于仔鼠,可激活相关脑区细胞凋亡通路。

硒(Se)因为其广泛的生理作用如抗氧化^[11,12]、提高机体免疫力^[13]而被熟知。机体持续缺硒可增加死亡风险^[14],导致免疫功能低下等等。研究认为,适当的补充硒可提高对病毒^[15]的抵抗力,维持男性和女性的生殖能力,并能够降低自身免疫性甲状腺疾病的风险^[16]。前瞻性研究显示机体较高的硒状态对前列腺癌^[17],肺癌^[18],大肠癌^[19],和膀胱癌^[20]等癌症的治疗和预后均有益处。研究还表明它能够有效地拮抗认知能力损伤^[20]。本研究在哺乳期大鼠染铅的同时也在饮水中补充了适当的硒。检测结果表明,在染铅的同时补硒,可有效的拮抗铅诱导的 Bcl-2/Bax 比值升高以及 Caspase-3 的活化,提示硒能够拮抗铅的损伤作用;同时染铅补硒组仔鼠海马区域神经细胞凋亡水平低于染铅组也验证了硒对铅的拮抗作用。

综上所述,本实验初步阐明了哺乳期铅暴露对仔鼠大脑海马组织的损伤作用,凋亡通路的激活在铅诱导的损伤过程中的重要作用,以及硒对铅损伤作用的保护作用,为进一步阐明铅神经毒性的作用机制以及探寻有效的防护措施提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] Koller K, Brown T, Spurgeon A, et al. Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112: 987-994
- [2] Needleman HL, McFarland C, Ness RB, et al. Bone lead levels in adjudicated delinquents. A case control study [J]. Neurotoxicol Teratol, 2002, 24: 711-717
- [3] Bellinger DC. Lead[J]. Pediatrics, 2004, 113: 1016-1022
- [4] Al-Saleh I, Nester M, Mashhour A, et al. Prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development: longitudinal study in Saudi Arabia[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2009, 28: 283-302
- [5] Liu MC, Liu XQ, Wang W, et al. Involvement of microglia activation in the lead induced long-term potentiation impairment[J]. PLoS One, 2012, 7: 43924
- [6] Smith AM, Picciano MF. Evidence for increased selenium requirement for the rat during pregnancy and lactation [J]. J Nutr, 1986, 116: 1068-1079
- [7] Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death [J]. FASEB J, 1992, 6(7): 2450-2455
- [8] Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology[J]. Cell Biochem Funct, 2011, 29(6): 468-480
- [9] Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo[J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 83-97
- [10] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351(1-2): 41-58
- [11] Xu Z, Wang Z, Li JJ, et al. Protective effects of selenium on oxidative damage and oxidative stress related gene expression in rat liver under chronic poisoning of arsenic[J]. Food Chem Toxicol, 2013, S0278-6915(13): 00240-00248
- [12] Sordillo LM. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle [J]. Vet Med Int, 2013, 2013: 154045
- [13] Ryan HM, Aldoori W. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases[J]. Can J Diet Pract Res, 2005, 66(2): 98-102
- [14] Hamdan L, Bost M, Chazot G, et al. Involvement of neuroleptic drugs in selenium deficiency and sudden death of cardiac origin: study and human post-mortem examination [J]. J Trace Elem Med Biol, 2012, 26(2-3): 170-173
- [15] Yu L, Sun L, Nan Y, et al. Protection from H1N1 influenza virus infections in mice by supplementation with selenium: a comparison with selenium-deficient mice[J]. Biol Trace Elem Res, 2011, 141(1-3): 254-261
- [16] Rayman MP. Selenium and human health[J]. Lancet, 2012, 379: 1256-1268
- [17] Richman EL, Chan JM. Selenium and prostate cancer: the puzzle isn't finished yet[J]. Am J Clin Nutr, 2012, 96(1): 1-2
- [18] Jablonska E, Gromadzinska J, Sobala W, et al. Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism[J]. Eur J Nutr, 2008, 47: 47-54
- [19] Takata Y, Kristal AR, King IB, et al. Serum selenium, genetic variation in selenoenzymes, and risk of colorectal cancer: primary analysis from the Women's Health Initiative Observational Study and meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 20: 1822-1830
- [20] Akbaraly TN, Hininger FI, Carriere I, et al. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly [J]. Epidemiology, 2007, 18: 52-58