

铅致幼鼠海马回及附近皮质细胞凋亡的实验研究

逯晓波, 吕相征, 郑丽舒, 李北利, 刘秋芳, 蔡 原

(中国医科大学公共卫生学院卫生毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 从细胞凋亡的角度探讨铅的发育神经毒性。方法 大鼠孕期及哺乳期不同剂量染铅, 用原子吸收分光光度法测定仔鼠血、脑铅含量, 取海马回及附近皮质用 TUNEL 法测定凋亡细胞数量。结果 染铅使出生后 7 天幼鼠海马回及附近皮质的细胞凋亡数量增加, 但对出生后 21 天幼鼠的影响不明显。结论 铅可通过增加海马回及附近皮质细胞凋亡数量而表现出发育神经毒性。

关键词: 铅; 海马; 细胞凋亡; 发育神经毒性

中图分类号: R995; O614. 433 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)01-0019-03

The experimental study on apoptosis of hippocampus and cortex cells in rat offsprings exposed to lead

LU Xiao-bo, LU Xiang-zheng, ZHENG Li-shu, LI Bei-li, LIU Qiu-fang, CAI Yuan

(China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the developmental neurotoxicity. **Method** The offsprings of rats exposed to lead during pregnant and breast-feeding period were used to determine the lead content in blood and brain, the apoptotic cells in hippocampus and cortex were also assayed by TUNEL method. **Result** The number of apoptotic cells in hippocampus and nearby cortex increased in the young rats at the 7th day after birth, but no obvious change in those at the 21st day after birth. **Conclusion** Lead could induce developmental neurotoxicity by excessive apoptosis of hippocampus and nearby cortex cells during developmental period.

Key words: Lead; Hippocampus; Apoptosis; Developmental neurotoxicity

铅能引起中枢及周围神经系统功能的改变, 发育中的神经系统对铅尤为敏感^[1]。铅可以选择性地聚集于海马区, 使海马 LTP (长时程效应) 表达受损, 而导致神经行为学的改变^[2]。但铅的毒性作用机制尚不完全清楚, 许多研究认为: 铅能促进活性氧自由基 (ROS) 产生, 使许多组织系统处于氧化应激状态^[3]。而 ROS 是细胞凋亡的介质或传递器^[4]。本研究通过大鼠孕期及哺乳期不同剂量染铅获得的幼鼠染铅模型, 观察在不同发育阶段铅对幼鼠海马回及附近皮质细胞凋亡状态的影响, 以期对铅致发育神经毒性的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与染毒

成年 Wistar 大鼠, 体质量 (230±20) g, 雌雄比为 2:1; 由中国医科大学实验动物中心提供。分笼饲养 7d 后, 按雌雄 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发现精子者定为已受

孕者, 并记为妊娠 0 d, 随机将 40 只受孕鼠分为 4 组, 每组 10 只。(1) 对照组; (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。染毒: 将醋酸铅溶于蒸馏水中, 实验组从受孕第 0 d 起饮用含铅水; 对照组从受孕第 0 d 起饮用蒸馏水, 直到仔鼠出生后第 7 d 或第 21 d。

1.2 取材

仔鼠出生后第 7 d 和第 21 d, 每组随机抽取 10 只, 断头采血, 用于血铅测定; 参照大鼠脑立体定位图谱, 取海马回, 称质量, 用于脑铅测定; 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, 生理盐水全身灌流, 待将血液基本冲净后, 再经 10% 甲醛灌注固定, 取海马回及附近皮质再固定于 10% 甲醛溶液中。石蜡包埋, 常规制成 4 μm 厚切片。检测前切片常规脱蜡至水。玻片经粘片胶多聚赖氨酸处理。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 血铅、脑铅含量测定: 原子吸收石墨炉分光光度法。

1.3.2 海马回及其周围皮质凋亡细胞形态观察及

收稿日期: 2001-05-15; 修回日期: 2001-07-13

作者简介: 逯晓波 (1969-), 女, 卫生毒理学硕士研究生, 研究方向为铅与神经系统毒性作用机制, 现在辽宁省肿瘤研究所工作。

记数：原位细胞凋亡标记法（TUNEL）。

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：蛋白酶 K 消化；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；过氧化氢-甲醇液中浸泡阻止内源性过氧化；滴加亲和素辣根过氧化物酶（Avidin-HRP）DAB 染色，苏木精轻度复染，脱水、透明、常规中性树脂封片。细胞计数采用 5 点

法（切片上、中、下、左、右 5 个点随机选择视野），以细胞核中发现棕黄颗粒判定为 TUNEL 阳性细胞。

1. 4 统计分析

将全部数据输入计算机，用 EXCEL、SPSS 软件进行实验数据统计分析，主要进行方差分析、Q 检验。

2 结果

2. 1 出生后第 7 d、21 d 各组幼鼠血铅、脑铅含量

表 1 出生后不同阶段各组幼鼠血铅、脑铅含量比较 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	出生后 7 d		出生后 21 d	
	血铅 ($\mu\text{mol/L}$)	脑铅 ($\mu\text{g/g}$)	血铅 ($\mu\text{mol/L}$)	脑铅 ($\mu\text{g/g}$)
对照组	0.26±0.09	0.06±0.02	0.29±0.04	0.13±0.07
实验 1 组	1.27±0.34 *	0.23±0.07 *	1.65±0.06 **	0.37±0.07 *
实验 2 组	2.02±0.79 **	0.49±0.26 **	2.71±0.32 **	0.64±0.18 **
实验 3 组	3.34±0.96 **	0.59±0.15 **	3.59±0.64 **	0.99±0.14 **

与对照组相比，* $P<0.05$ ** $P<0.01$

表 1 可见，无论出生后 7 d 还是出生后 21 d 幼鼠各染铅组血铅含量及脑铅含量均显著高于对照组，且随着染铅剂量的升高而升高。

2. 2 染铅对出生后 7 d、21 d 幼鼠海马回及附近皮质细胞凋亡的影响

海马回和皮质每 100 个细胞中的 TUNEL 阳性细胞数。

由表 2 可见，出生后 7 d 时，实验 3 组与对照组相比，仔鼠脑组织皮质 TUNEL 阳性细胞核数有明显升高 ($F=3.481$, $P<0.05$)；出生后 21 d 时，无论海马回还是皮质，各染铅组与对照组相比，TUNEL 阳性细胞数未见明显差异。

显微镜 400 倍视野下分别计数各实验组与对照组

表 2 出生后 7、21 d 幼鼠海马回、皮质 TUNEL 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	出生后 7 d		出生后 21 d	
	皮质区	海马区	皮质区	海马区
对照组	17.44±3.32	7.78±1.78	5.72±1.84	2.72±1.01
实验 1 组	18.09±4.20	7.66±3.35	5.66±0.82	2.44±0.88
实验 2 组	20.00±4.94	7.50±2.01	6.20±1.75	2.49±1.61
实验 3 组	22.67±4.03 *	8.08±1.92	6.08±2.60	3.16±1.34

与对照组相比，* $P<0.05$

3 讨论

细胞凋亡是受基因调控的细胞主动自杀现象。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^[5]。然而，暴露于低剂量离子辐射或化学毒物所致细胞凋亡亦具有毒理学意义。

果发现，1 $\mu\text{mol/L}$ 铅暴露不影响谷氨酸所致的神经元细胞坏死，但却促进了细胞凋亡的发生。更为重要的是，新生大鼠的小脑颗粒细胞培养中铅所致细胞凋亡的浓度位于铅致儿童发生神经行为改变的血浆浓度范围^[6]。低浓度铅离子促进新生大鼠神经细胞凋亡，可能有助于解释神经系统发育期铅具有更大毒性。

Oberto 认为：在中枢神经系统发育期，铅行使其神经毒性作用是通过细胞病理性的自杀过程，即细胞凋亡来进行的。他们使用出生后 6~8 天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

在体内环境中，铅是否能诱导发育期神经元细胞的凋亡，许多研究表明：铅能增加 ROS 而使中枢神经系统处于氧化应激状态^[3]。中枢神经系统因含丰富

的多不饱和脂肪酸更易受到 ROS 的攻击。而很多能引起氧化损伤的化合物和物理处理方法也能诱导细胞凋亡。据报道在大鼠小脑颗粒细胞中, Fenton 反应所产生的羟自由基能导致细胞凋亡, 同时伴有细胞内脂质过氧化产物 TBARS 的增加^[7]。可见, 在铅、ROS 以及细胞凋亡之间可能存在某些内在联系。本研究结果表明, 在出生 7 d 时, 高剂量染铅组仔鼠 [血铅浓度大于 $(3.34 \pm 0.96) \mu\text{mol/L}$ 时] 脑组织海马回附近皮质区 TUNEL 阳性细胞数与对照组相比有明显升高。但对出生后 21 d 的仔鼠, 染铅对脑组织海马回及附近皮质细胞凋亡的影响不明显。幼鼠出生后 7 d 为神经系统发育进程中生理性的细胞凋亡高峰期, 对影响细胞凋亡的因素更为敏感, 染铅使 ROS 增加, 而 ROS 介导细胞凋亡, 这样可能导致海马回附近皮质细胞凋亡过量。而仔鼠出生 21 d 后, 生理性细胞凋亡已基本结束, 机体保护性调控作用加强, 染铅所致 ROS 的增加对细胞凋亡作用相对减弱, 故并未改变凋亡细胞的数量。然而, 在细胞凋亡信号传导通路中许

多环节还有待于进一步破解, 铅致发育期脑细胞凋亡过量的机制也同样需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Gillan L. Perspectives on lead toxicity [J]. Clin Biol, 1993, 26: 371-381.
- [2] Altmann L, Sreinsson K, Wiengl H. Long-term potentiation in rat hippocampal slice is impaired following acute lead perfusion [J]. Neurosci Lett, 1991, 128: 190.
- [3] Adonayb V N, Oteiza P I. Lead intoxication: antioxidant defense and oxidative damage in rat brain [J]. Toxicology, 1999, 135: 77-85.
- [4] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 153.
- [5] Junying Yuan. Apoptosis in the nervous system [J]. Nature, 2000, 407: 802-813.
- [6] Oberio A. Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications [J]. J Pharm and Experi Thera, 1996, 279: 435-442.
- [7] Wenjuan Xin, Taotao Wei, Chang Chen. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxylradical and the effects of EGb761 and its constituents [J]. Toxicology, 2000, 148: 103-108.

毒鼠强与氟乙酰胺混合中毒 1 例报告

苏素花, 农 康

(广西壮族自治区工人医院, 广西 南宁 530021)

我院于 2000 年 8 月 26 日收治 1 例毒鼠强、氟乙酰胺混合中毒患者, 现报告如下。

1 基本情况

患者, 男性, 55 岁, 自 1989 年以来, 从事灭鼠药毒鼠强、氟乙酰胺的加工 (将毒鼠强、氟乙酰胺各约 100g 放入锅内, 加水煮至全溶解加入谷子, 浸泡至谷子发胀后, 取出凉干, 分装成小袋即为灭鼠的毒饵)。每月加工分装 2 次, 2000 年以来每月加工 3 次, 自行销售。加工、分装均在自家住房里进行, 手工操作。患者未戴手套、口罩, 两手沾满药液, 未洗手就吸烟、喝水或进食。如此间断接触灭鼠药 10 年。

2 临床资料

1995 年开始感头晕、头痛、乏力、胸闷、失眠、恶心及食欲不振。曾在当地医院住院 1 周, 拟诊为“神经衰弱综合征”, 经治疗效果欠佳。出院后仍继续原工作, 临床症状日渐加重。2000 年 8 月 18 日无明显诱因出现一过性四肢抽搐, 每天 2~4 次, 抽搐时意识清, 无大小便失禁。2000 年 8 月 22 日下午 5 时许, 患者骑自行车回家时突然晕倒, 意识丧失, 四肢抽搐, 短时间内意识恢复, 无大小便失禁。2000 年 8 月 26 日

到我院就诊。体检: T 37.1℃, P 88 次/分, R 20 次/分, BP 100/70 mmHg。意识清, 慢性病容, 左侧面部和左手背散在性皮肤擦伤已基本愈合, 心肺及腹部检查正常。瞳孔对光反射存在, 未引出病理反射。

实验室检查: 血、尿常规, 血糖, 肾功能及电解质检查结果均正常。ALT 88 U/L (正常参考值 5~25 U/L), AST 92 U/L (正常参考值 8~28 U/L)。血、尿中均检出毒鼠强和氟乙酰胺 (气相色谱法)。肝、胆、脾、肾 B 超及心电图检查正常。X 线胸片: 双肺纹理增多, 肺门结构紊乱, 未见实质病变。脑电图中度异常。脑电地形图异常, δ 0 高功率, 枕区 δ 频段功率、两侧欠对称 (右 > 左)。未出现癫痫波。患者入院后立即给予乙酰胺、苯巴比妥钠、还原型谷胱甘肽、能量合剂及输液等治疗, 症状迅速缓解, 不再抽搐, 饮食正常。复查除血、尿中检出毒鼠强及微量氟乙酰胺外, 其他检查结果均正常。患者精神好转, 住院 16 天, 要求出院。

3 小结

本例诊断为毒鼠强、氟乙酰胺混合中毒主要依据有: (1) 患者长期接触这两种灭鼠药, 又缺乏个人防护, 所以很有可能通过消化道等途径进入体内而中毒; (2) 临床表现符合这两种灭鼠药中毒特点; (3) 血尿中检出毒鼠强及氟乙酰胺。