

## 铅暴露对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响

薛玲<sup>a</sup>, 李政堃<sup>a</sup>, 张可欣<sup>a</sup>, 高福佳<sup>a</sup>, 曹福源<sup>b</sup>, 王雨冉<sup>a</sup>, 张艳淑<sup>a</sup>

### 摘要:

[目的] 探讨铅(Pb)暴露对快速衰老小鼠(SAMP8)学习记忆能力的影响及其机制。

[方法] 雄性SAMP8小鼠及其野生型SAMR1小鼠各20只,各随机分为2组,即SAMR1组、SAMR1+Pb组和SAMP8组、SAMP8+Pb组。SAMR1+Pb组和SAMP8+Pb组小鼠每天饲以0.05 g/L醋酸铅饮用水, SAMR1组和SAMP8组小鼠每天饲以0.05 g/L醋酸钠饮用水,共饮水9周。应用Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力;采用免疫荧光法测定实验小鼠侧脑室下区(SVZ)淀粉样前体蛋白(APP)、神经母细胞和星形胶质样细胞特异性标志物[双皮质素(DCX)、神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)]的表达情况,分析神经母细胞和星形胶质细胞的细胞比率变化;应用实时荧光定量PCR检测实验小鼠SVZ中DCX、GFAP和脑源性神经营养因子(BDNF)的mRNA表达情况。

[结果] 小鼠Morris水迷宫实验第3天结果显示:与SAMR1组[(10.94 ± 3.98)s]相比, SAMP8组[(29.24 ± 6.15)s]、SAMR1+Pb组[(34.15 ± 6.78)s]和SAMP8+Pb组[(50.86 ± 8.56)s]的逃避潜伏期延长,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );且与SAMP8组和SAMR1+Pb组小鼠比较, SAMP8+Pb组小鼠的逃避潜伏期更长( $P < 0.05$ )。SAMR1组、SAMP8组、SAMR1+Pb组和SAMP8+Pb组小鼠的平均穿越平台次数分别为(6.75 ± 1.28)、(3.25 ± 1.28)、(3.88 ± 1.46)、(1.25 ± 0.46)次;SAMP8组、SAMR1+Pb组和SAMP8+Pb组小鼠穿越次数较SAMR1组均减少( $P < 0.05$ );SAMP8+Pb组小鼠穿越次数也明显低于SAMP8组和SAMR1+Pb组( $P < 0.05$ )。免疫荧光法测定结果显示:与SAMR1组小鼠比较, SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠SVZ区APP荧光强度分别上升了79%、53%和216%;与SAMR1+Pb组和SAMP8组比较, SAMP8+Pb组小鼠APP荧光强度分别上升了76%和107%,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与SAMR1组小鼠比较, SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠SVZ中GFAP(+) / DAPI(+)和DCX(+) / DAPI(+)细胞比率均降低, SAMP8+Pb组小鼠SVZ的GFAP(+) / DAPI(+)和DCX(+) / DAPI(+)细胞比率分别为SAMP8组小鼠的22%和59%。实时荧光定量PCR分析结果显示:与SAMR1组小鼠相比, SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠SVZ中BDNF和DCX mRNA表达明显下降( $P < 0.05$ );SAMP8+Pb组小鼠BDNF mRNA表达较SAMR1+Pb组和SAMP8组小鼠分别下降了85%和83%, DCX mRNA表达则分别下降了81%和60%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠的GFAP mRNA表达较SAMR1组明显下降,并且SAMP8+Pb组小鼠GFAP mRNA表达较SAMR1+Pb组和SAMP8组分别下降了89%和69%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

[结论] 铅暴露可导致快速衰老小鼠SVZ中APP表达增加和BDNF mRNA表达下降,同时加剧SVZ中星形胶质样细胞丢失,逃避潜伏期延长,穿台次数下降,提示铅暴露加剧快速衰老小鼠学习记忆能力的下降。

关键词: 铅;快速衰老小鼠;学习记忆;脑源性神经营养因子;淀粉样前体蛋白

引用: 薛玲, 李政堃, 张可欣, 等. 铅暴露对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响及其机制研究[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(7): 586-592. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16713

**Effects of lead exposure on learning and memory ability of senescence accelerated mice** XUE Ling<sup>a</sup>, LI Zheng-yao<sup>a</sup>, ZHANG Ke-xin<sup>a</sup>, GAO Fu-jia<sup>a</sup>, CAO Fu-yuan<sup>b</sup>, WANG Yu-ran<sup>a</sup>, ZHANG Yan-shu<sup>a</sup> (a.School of Public Health b.Medical Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China). Address correspondence to ZHANG Yan-shu, E-mail: yanshu\_zhang@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

### Abstract:

[Objective] To investigate the effects and related mechanism of lead (Pb) exposure on learning and memory ability of senescence

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81373033, 81673208)

[作者简介] 薛玲(1974—),女,博士生;研究方向:神经毒理学;E-mail: xueling\_heuu@163.com

[通信作者] 张艳淑, E-mail: yanshu\_zhang@163.com

[作者单位] 华北理工大学 a. 公共卫生学院 b. 医学实验动物中心, 河北 唐山 063210

accelerated mice (SAMP8).

[ Methods ] Twenty male SAMP8 mice and 20 male SAMR1 mice were randomly divided into four groups: SAMR1, SAMR1+Pb exposure, SAMP8, and SAMP8+Pb exposure groups. Mice in the SAMR1+Pb exposure group and the SAMP8+Pb exposure group were treated with 0.05 g/L lead acetate via drinking water for nine weeks, and mice in the SAMR1 group and the SAMP8 group were given 0.05 g/L sodium acetate via drinking water for nine weeks. Morris water maze experiment was applied to test learning and memory ability. Protein expressions of amyloid precursor protein (APP), doublecortin (DCX), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in subventricular zone (SVZ) were observed by immunofluorescence, and the cell counts of neuronal progenitors and astrocytes were analyzed. The mRNA expressions of *DCX*, *GFAP*, and brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) in SVZ were detected by quantitative real-time PCR.

[ Results ] The results of Morris water maze test on day 3 showed that, compared with the SAMR1 group [(10.94 ± 3.98)s], the escape latencies of the SAMR1+Pb exposure group [(34.15 ± 6.78)s], the SAMP8 group [(29.24 ± 6.15)s], and the SAMP8+Pb exposure group [(50.86 ± 8.56)s] were increased ( $P < 0.05$ ); compared with the SAMP8 group and the SAMR1+Pb exposure group, the escape latency of the SAMP8+Pb exposure group was extended ( $P < 0.05$ ); the number of platform crossings were 6.75 ± 1.28 in the SAMR1 group, 3.88 ± 1.46 in the SAMR1+Pb exposure group, 3.25 ± 1.28 in the SAMP8 group, and 1.25 ± 0.46 in the SAMP8+Pb exposure group; the numbers in the SAMR1+Pb exposure group, SAMP8 group, and SAMP8+Pb exposure group were lower than those in the SAMR1 group ( $P < 0.05$ ); compared with the SAMP8 group and the SAMR1+Pb exposure group, the number in the SAMP8+Pb exposure group was also decreased ( $P < 0.05$ ). The results of immunofluorescence technology showed that, compared with SAMR1 mice, the fluorescence intensity of APP increased by 79%, 53%, and 216% in the SAMR1+Pb exposure group, SAMP8 group, and SAMP8+Pb exposure group, respectively; compared with the SAMR1+Pb exposure group and the SAMP8 group, the fluorescence intensity of APP in the SAMP8+Pb exposure group increased by 76% and 107%, respectively ( $P < 0.05$ ). Compared with the SAMR1 group, the cell ratios of GFAP(+)/DAPI(+) and DCX(+)/DAPI(+) in SVZ of the SAMP8 group and the SAMP8+Pb exposure group were decreased; the ratios of GFAP(+)/DAPI(+) and DCX(+)/DAPI(+) in SVZ of the SAMP8+Pb exposure group were 22% and 59% of the SAMP8 group, respectively. Compared with the SAMR1 group, the expression of *BDNF* and *DCX* mRNA in the SAMR1+Pb exposure group, SAMP8 group, and SAMP8+Pb exposure group were significantly decreased by real-time fluorescence quantitative PCR ( $P < 0.05$ ). Compared with the SAMR1+Pb exposure group and the SAMP8 group, the expressions of *BDNF* mRNA in the SAMP8+Pb exposure group were decreased by 85% and 83%, respectively, and the expressions of *DCX* mRNA were decreased by 81% and 60%, respectively ( $P < 0.05$ ). The expressions of *GFAP* mRNA in the SAMP8 group and SAMP8+Pb exposure group were significantly lower than that in the SAMR1 group ( $P < 0.05$ ); the expression of *GFAP* mRNA in the SAMP8+Pb exposure group was decreased by 89% and 69% compared with the SAMR1+Pb group and the SAMP8 group, respectively ( $P < 0.05$ ).

[ Conclusion ] Our findings show that lead exposure can aggravate the increasing of APP protein expression and the decreasing of *BDNF* mRNA expression, as well as result in less astrocytes in SVZ, prolonged escape latency, and reduced platform crossing counts, which indicate that lead exposure may accelerate the decline of learning and memory ability in senescence accelerated mice.

**Keywords:** lead; senescence accelerated mouse; learning and memory; brain-derived neurotrophic factor; amyloid precursor protein

**Citation:** XUE Ling, LI Zheng-yao, ZHANG Ke-xin, et al. Effects of lead exposure on learning and memory ability of senescence accelerated mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(7): 586-592. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16713

铅(Pb)是一种在生产和日常生活中广泛存在的重金属神经毒物,可被广泛应用于多种产品中,环境污染带来的健康威胁一直是公共卫生的热点问题。目前针对铅暴露致神经损伤的研究人群多集中于儿童和成年人,而针对老年人群铅暴露后的神经损伤研究报道不多。研究表明,老化过程中会出现大脑皮质、海马等区域神经元的丢失,导致学习记忆及认知能力下降;而生命早期铅暴露可产生阿尔茨海默病样作用,表现为学习记忆能力下降<sup>[1]</sup>。铅暴露是否会加剧老龄化人群的神经损伤及认知障碍值得关注。有研究显示,铅暴露可导致淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)过度表达,从而导致 $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ )

蓄积,造成神经细胞损害。此外,铅暴露还可以导致脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达降低<sup>[2-3]</sup>。BDNF能改善神经元的病理状态、促进受损神经元再生,对神经细胞的损伤修复具有重要作用。同样,研究早已经证实老年的人和动物脑组织中APP过度表达,且老年痴呆患者脑组织出现BDNF表达的下降<sup>[4]</sup>,那么铅暴露是否能影响衰老动物APP和BDNF表达的改变有待研究。

铅致神经细胞损伤的机制较为复杂,有研究表明成年小鼠的神经发生与学习记忆能力呈正相关<sup>[5-6]</sup>,侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒下区是神经发生的重要区域,以往关于铅暴露致

学习记忆损伤的研究主要集中于海马区,而SVZ神经发生细胞的损伤在铅致神经毒性中的作用还未见报道。神经元母细胞和星形胶质样细胞均为SVZ具有分化潜能的细胞,双皮质素(doublecortin, DCX)和神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)分别是SVZ中神经元母细胞和星形胶质样细胞的特异性标志。SAMP8是目前公认的比较理想的快速衰老模型小鼠,常被用于衰老相关研究;SAMP8小鼠的野生型小鼠(SAMR1),常用于对照。本研究以SAMP8和SAMR1小鼠为研究对象,探讨铅暴露对SAMP8小鼠脑组织SVZ的APP和BDNF mRNA的表达,SVZ神经细胞损伤的影响,以期为衰老人群铅暴露的神经损伤机制研究提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

醋酸铅和醋酸钠(天津市大茂化学试剂厂,中国),逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒(Roche,瑞士),Triton X-100、GFAP一抗(Sigma,德国),DCX一抗、山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗(Abcam,英国),超声匀浆器VCX130(Sonics,美国),低温高速离心机Scientific Fresco 21(Thermo,美国),荧光定量PCR仪LightCycler 96型(Roche,瑞士),多功能酶标仪Spectra Max MS(Molecular Devices,美国),冰冻切片机CM1950(Leica,德国),激光扫描共聚焦显微镜FV1000(Olympus,日本)。

### 1.2 动物分组与染毒方法

雄性SAMP8小鼠和SAMR1小鼠各20只,体重( $20 \pm 1$ )g,购自北京大学实验动物中心。实验前适应性饲养一周,饲养温度、湿度范围分别是20~26℃、50%~60%,12h昼夜交替,适应性饲养期间小鼠自由饮食饮水。适应性饲养1周后,按照体重将SAMP8和SAMR1小鼠各随机分为2组,即SAMR1组、SAMP8组、SAMR1+Pb组和SAMP8+Pb组,每组各10只。SAMR1+Pb组和SAMP8+Pb组小鼠每天饲以0.05 g/L醋酸铅饮水,而SAMR1组、SAMP8组小鼠每天饲以0.05 g/L醋酸钠饮水作为对照,共9周。

### 1.3 Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力

应用Morris水迷宫实验测试小鼠的学习和记忆能力,前3天为定位航行实验,用于测量小鼠空间学习能力,将小鼠从距离水下平台最远的一个象限放入直径130 cm、高50 cm的水池中,记录小鼠找到水下平台

的时间,即为逃避潜伏期。2 min内未找到平台,则引导小鼠登上平台,停留20 s。如此在另3个象限重复此过程,最后将小鼠擦干放回鼠笼。第4天,为空间探索实验,移除平台,将小鼠放入水中,记录在2 min内小鼠穿越原平台所在位置的次数,作为空间记忆能力的检测指标。

### 1.4 实验小鼠SVZ中APP、DCX和GFAP的免疫荧光观察

实验小鼠经异氟烷麻醉后,心脏灌注固定,断头取脑,置于4%多聚甲醛固定,4 h过夜,然后放入30%的蔗糖中浸泡至脑组织沉底,置于OCT(optimal cutting temperature)包埋剂中,-80℃冻存。应用冰冻切片机对脑组织进行连续切片,片厚30 μm。分别以1:100体积稀释的兔抗GFAP、1:1000体积稀释的兔抗DCX、1:400体积稀释的兔抗APP作为一抗,以DyLight™488标记的山羊抗兔IgG(1:200)为荧光二抗,采用DAPI对细胞和组织进行染色,对脑组织切片进行免疫荧光染色,然后利用激光扫描共聚焦显微镜(波长为488 nm,分辨率为1024×1024)扫描,观察SVZ中DCX(+)、GFAP(+)细胞数及APP的表达情况,再利用Image J软件测定DCX(+)和GFAP(+)细胞数,并计算DCX(+)、GFAP(+)与DAPI(+)的细胞比率。

### 1.5 实验小鼠SVZ中DCX、GFAP、BDNF mRNA表达水平检测

实验小鼠麻醉后取脑,置于冰板上,迅速剥离SVZ组织,放入加有trizol的无酶EP管中,使用超声匀浆仪裂解组织,裂解后取上清,提取总mRNA,再利用酶标仪对提取的mRNA浓度和纯度进行检测。根据mRNA浓度使用反转录试剂盒将mRNA反转录为cDNA。分别以DCX、GFAP、BDNF的cDNA为模板,以β-actin为内参基因,应用Roche LightCycler® 96实时荧光定量PCR仪进行扩增,95℃ 3 min,95℃ 30 s,55~65℃ 10 s;72℃ 30 s,扩增45个循环。实时荧光定量PCR所用引物序列(5'-3')分别为:DCX上游引物ACCAGCAGAAACCGGTGAG,下游引物AAGAAAGCCGTGTGCTTGT;GFAP上游引物GTTACCAGGAGGCACTTGCT,下游引物ACAGGAATGGTGATGCGGTT;BDNF上游引物GCCTAACAGTGTTCAGATAAAAG,下游引物TGCAAACACTGTAGGCCATATTAC;β-actin上游引物GTTGGTTGGAGCAAACATCCC,下游引物TTAGGAGTGGGGGTGGCTTT。



## 1.6 统计学分析

实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。多组均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用  $q$  检验;数据的交互作用分析采用析因设计的方差分析,检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 铅暴露对实验小鼠学习记忆能力的影响

研究结果显示,SAMP8组、SAMR1+Pb组及SAMP8+Pb组小鼠逃逸潜伏期均长于SAMR1组小鼠,第2、3天SAMP8+Pb组小鼠逃逸潜伏期明显长于SAMP8组和SAMR1+Pb组(均  $P<0.05$ )。与SAMR1组小鼠相比,SAMP8组、SAMR1+Pb组及SAMP8+Pb组小鼠穿台次数明显减少,且SAMP8+Pb组小鼠穿台次数少于SAMP8组和SAMR1+Pb组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。第3天逃避潜伏期分析结果显示:SAMP8+Pb组/SAMP8组为1.74。对穿台次数进行比较,结果显示:SAMP8+Pb组/SAMP8组为0.57,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结果见表1。

表1 铅暴露对实验小鼠学习记忆能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 The effects of lead exposure on learning and memory ability of mice

组别 Group	逃避潜伏期(s) Escape latency			穿台次数 Frequency of crossing the platform
	第1天 Day 1	第2天 Day 2	第3天 Day 3	
SAMR1组 SAMR1 group	45.11 ± 10.51	32.73 ± 6.34	10.94 ± 3.98	6.75 ± 1.28
SAMR1+Pb组 SAMR1+Pb group	72.82 ± 9.37 <sup>a</sup>	50.07 ± 7.01 <sup>a</sup>	34.15 ± 6.78 <sup>a</sup>	3.88 ± 1.46 <sup>a</sup>
SAMP8组 SAMP8 group	65.67 ± 10.11 <sup>a</sup>	47.75 ± 8.18 <sup>a</sup>	29.24 ± 6.15 <sup>a</sup>	3.25 ± 1.28 <sup>a</sup>
SAMP8+Pb组 SAMP8+Pb group	84.79 ± 19.72 <sup>a</sup>	74.30 ± 7.76 <sup>abc</sup>	50.86 ± 8.56 <sup>abc</sup>	1.25 ± 0.46 <sup>abc</sup>

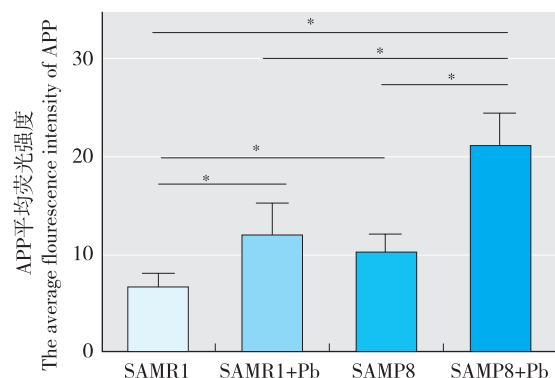
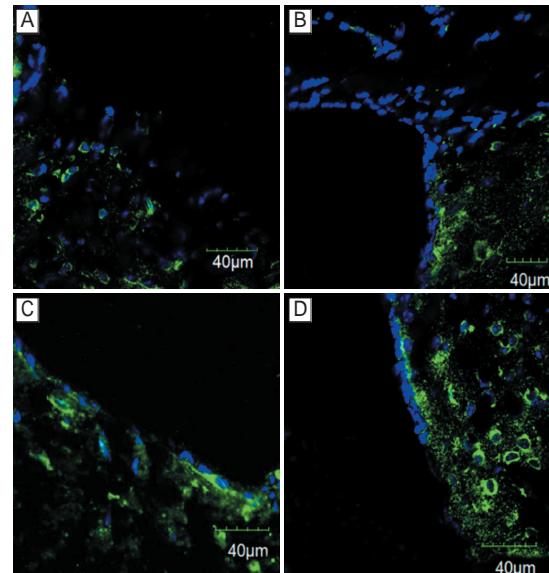
[注] a: 与SAMR1组比较,  $P<0.05$ ; b: 与SAMR1+Pb组比较,  $P<0.05$ ; c: 与SAMP8组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with SAMR1 group,  $P<0.05$ ; b: Compared with SAMR1+Pb group,  $P<0.05$ ; c: Compared with SAMP8 group,  $P<0.05$ 。

### 2.2 铅暴露对实验小鼠SVZ中APP表达的影响

通过激光扫描共聚焦显微镜荧光二抗的平均荧光强度发现,SAMR1组、SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组的APP平均荧光强度值分别为  $6.66 \pm 1.41$ 、 $11.94 \pm 3.24$ 、 $10.17 \pm 1.77$  和  $21.05 \pm 3.33$ 。进一步分析发现:SAMP8+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠大脑SVZ的APP荧光强度较SAMR1组分别上升了

79%、53%和216%;SAMP8+Pb组小鼠SVZ的APP荧光强度较SAMR1+Pb组和SAMP8组分别上升了76%和107%,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );但研究未发现SAMR1+Pb组小鼠SVZ的APP表达与SAMP8组小鼠有差异( $P>0.05$ )。见图1。



[注] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb。\*: 两组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb.

\*: Comparison between two groups,  $P<0.05$ 。

图1 实验小鼠SVZ中APP表达情况

( $\times 600$ , DAPI·蓝色, APP·绿色)

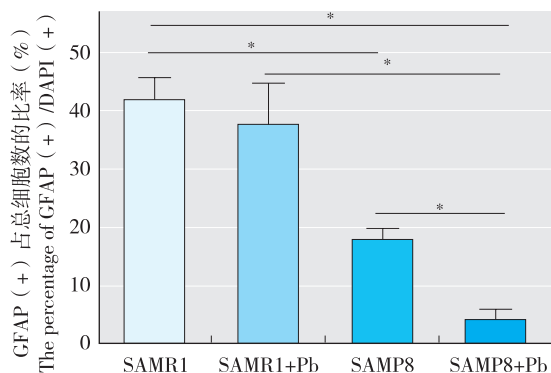
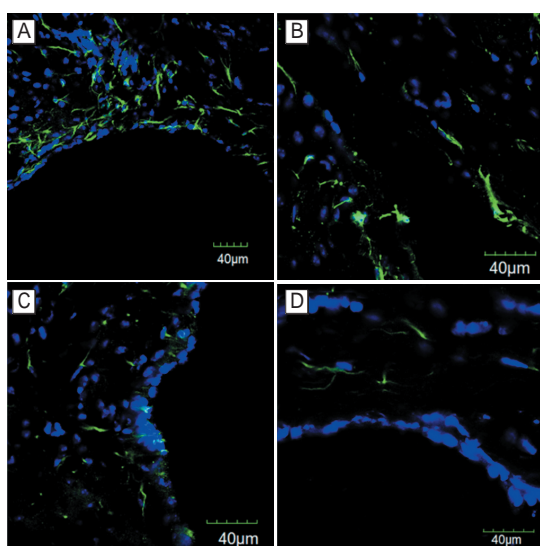
Figure 1 The expression of APP in SVZ of mice

### 2.3 铅暴露对实验小鼠SVZ中GFAP和DCX阳性表达的影响

通过免疫荧光法测定小鼠SVZ中GFAP(+)细胞和DCX(+)细胞表达情况。图2显示,SAMR1组、SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠GFAP(+)/DAPI(+)细胞比率分别为:  $[41.6 \pm 4.03]\%$ 、 $[37.7 \pm 7.07]\%$ 、 $[18.25 \pm 1.63]\%$ 和 $[4.00 \pm 1.75]\%$ 。与SAMR1组比较,SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠SVZ中的GFAP(+)

DAPI(+)细胞比率分别下降了56%和90%,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。进一步比较发现,SAMP8+Pb组小鼠GFAP(+)/DAPI(+)细胞比率是SAMP8组的22%;而SAMR1+Pb组与SAMR1组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

图3显示,SAMR1组、SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠SVZ中DCX(+)/DAPI(+)细胞比率,分别为:[ $(59.41 \pm 2.22)\%$ ][ $(32.72 \pm 1.93)\%$ ][ $(27.94 \pm 4.19)\%$ ]和[ $(16.57 \pm 1.31)\%$ ]。与SAMR1组小鼠相比,SAMR1+Pb组、SAMP8组小鼠和SAMP8+Pb组的DCX(+)/DAPI(+)细胞比率较SAMR1组分别下降了45%、53%和72%。进一步比较发现,SAMP8+Pb组小鼠SVZ中DCX(+)/DAPI(+)细胞比率是SAMP8组的59%,SAMR1+Pb组是SAMR1组的55%。



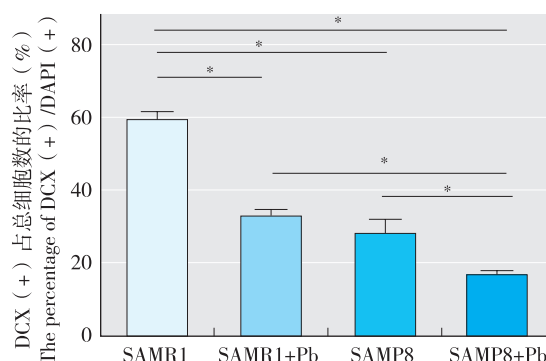
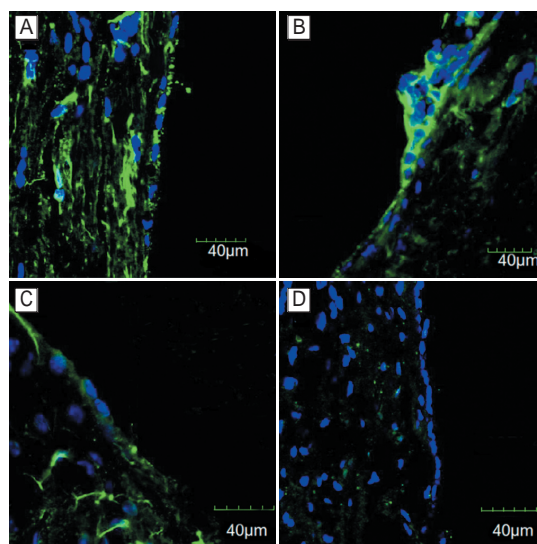
[注] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb。\*: 两组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb.

\*: Comparison between two groups,  $P<0.05$ .

图2 实验小鼠SVZ中GFAP(+)细胞比率  
( $\times 600$ , DAPI·蓝色, GFAP·绿色)

Figure 2 The percentage of GFAP(+) cells in SVZ of mice



[注] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb。\*: 两组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] A: SAMR1; B: SAMR1+Pb; C: SAMP8; D: SAMP8+Pb.

\*: Comparison between two groups,  $P<0.05$ .

图3 实验小鼠SVZ中DCX(+)细胞比率  
( $\times 600$ , DAPI·蓝色, DCX·绿色)

Figure 3 The percentage of DCX(+) cells in SVZ of mice

## 2.4 铅暴露对实验小鼠SVZ的BDNF、DCX和GFAP mRNA表达的影响

析因设计方差分析结果显示:铅暴露能够使SAMP8小鼠SVZ区BDNF mRNA的表达进一步下降( $F=10.87$ ,  $P=0.003$ )。与SAMR1组比较,SAMR1+Pb组、SAMP8组和SAMP8+Pb组小鼠BDNF mRNA表达均明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而与SAMR1+Pb组和SAMP8组小鼠相比,SAMP8+Pb组小鼠SVZ中BDNF mRNA表达分别下降了85%和83%( $P<0.05$ )。

析因分析结果显示:铅暴露和衰老两个因素对DCX和GFAP mRNA表达均存在交互效应( $F_{DCX}=8.583$ ,  $P_{DCX}=0.007$ ;  $F_{GFAP}=10.974$ ,  $P_{GFAP}=0.003$ )。进一步分析发现:SAMR1+Pb组、SAMP8组、SAMP8+Pb组小鼠DCX mRNA表达较SAMR1组小鼠明显下降;且

SAMP8+Pb组小鼠 *DCX* mRNA 表达较 SAMR1+Pb 组和 SAMP8 组分别下降了 81% 和 60%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。相较于 SAMR1 组, SAMP8 组和 SAMP8+Pb 组小鼠 *GFAP* mRNA 的表达明显下降, 并且 SAMP8+Pb 组小鼠 *GFAP* mRNA 表达较 SAMR1+Pb 组和 SAMP8 组分别下降了 89% 和 69%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但未发现 SAMR1 组小鼠 SVZ 中 *GFAP* mRNA 表达与 SAMR1+Pb 组小鼠有差异。见表 2。

表 2 实验小鼠 SVZ 中 *DCX* 和 *GFAP* mRNA 表达情况  
( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 The mRNA expression of *DCX* and *GFAP* in SVZ of mice

组别( Group )	<i>BDNF</i>	<i>DCX</i>	<i>GFAP</i>
SAMR1 组( SAMR1 group )	1.00 ± 0.44	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12
SAMR1+Pb 组( SAMR1+Pb group )	0.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.09
SAMP8 组( SAMP8 group )	0.23 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.35 ± 0.07 <sup>ab</sup>
SAMP8+Pb 组( SAMP8+Pb group )	0.04 ± 0.02 <sup>abc</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>abc</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>abc</sup>

[ 注 ] a : 与 SAMR1 组比较,  $P < 0.05$ ; b : 与 SAMR1+Pb 组比较,  $P < 0.05$ ; c : 与 SAMP8 组比较,  $P < 0.05$ 。

[ Note ] a : Compared with the SAMR1 group,  $P < 0.05$ ; b : Compared with the SAMR1+Pb group,  $P < 0.05$ ; c : Compared with the SAMP8 group,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

众所周知, 铅暴露可导致实验动物和职业人群的认知功能下降<sup>[7-8]</sup>。本研究应用快速衰老模型 SAMP8 小鼠探讨铅暴露对衰老机体神经行为的影响。结果表明, SAMP8 小鼠的逃避潜伏期长于 SAMR1 小鼠, 穿台次数少于 SAMR1 小鼠, 说明衰老已对实验小鼠的空间学习能力造成一定的损伤, Markowska 等<sup>[9]</sup>的研究结果也提示 SAMP8 小鼠的学习记忆功能会出现这种变化。本研究还发现, 铅暴露均可引发 SAMR1 小鼠和 SAMP8 小鼠学习记忆功能下降, 从实验小鼠第 3 天的逃避潜伏期和平均穿台次数可知, 铅明显加重了对 SAMP8 小鼠空间记忆能力的损伤; 值得关注的是, 同样在铅暴露下, SAMP8 小鼠空间学习能力下降程度小于 SAMR1。SAMP8 组小鼠逃避潜伏期为 SAMR1 组小鼠的 2.67 倍, 表明衰老已对实验小鼠的空间学习能力造成一定的损伤, 这可能是铅对 SAMP8 小鼠空间学习能力的损伤程度小于对 SAMR1 小鼠的原因之一。

A $\beta$  蛋白是 APP 在  $\beta$ -、 $\gamma$ -蛋白酶作用下的剪切产物, A $\beta$  蛋白沉积于脑组织可形成老年斑, 进而影响神经细胞的正常功能; APP mRNA 过度表达, 导致 APP 的增加, 从而 A $\beta$  蛋白产生增加<sup>[10]</sup>。本研究发现, SAMR1 组小鼠铅暴露后, SVZ 中 APP 表达明显增

加, 这与有关研究显示早期铅暴露可导致海马组织中 APP 表达增加的结果一致<sup>[11-13]</sup>。SAMP8+Pb 组小鼠 SVZ 中 APP 的表达水平明显高于 SAMR1+Pb 组小鼠和 SAMP8 组小鼠, 研究结果提示铅暴露可以引发 SAMP8 小鼠 SVZ 中 APP 表达升高的现象, 且通过对比荧光强度发现, SAMP8+Pb 组小鼠较 SAMR1+Pb 组小鼠 APP 蛋白表达的升高更为明显, 这提示铅暴露加强了快速衰老小鼠 SVZ 中 APP 的表达。APP 表达上调时, A $\beta$  的沉积会增加, 加剧神经细胞的氧化损伤<sup>[14-15]</sup>。BDNF 是体内合成的一种具有促进神经生长活性的蛋白质, 它与神经细胞上的受体结合, 对神经细胞的存活、分化、生长发育起重要作用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 铅暴露能够下调 SAMR1 小鼠和 SAMP8 小鼠大脑 SVZ 中 *BDNF* mRNA 表达; 陈晓珑等<sup>[3]</sup>的研究发现, 铅暴露后在海马组织中 BDNF 的表达也下降。当 *BDNF* mRNA 的表达下降后, 可能导致 BDNF 表达水平下降, 使谷氨酸效应受体活性依赖的 BDNF 信号转导通路受到干扰, 神经细胞突触可塑性受到损伤, 进而影响神经系统的正常功能<sup>[17]</sup>。Holsinger 等<sup>[18]</sup>的研究还显示, BDNF 对阿尔茨海默病发病有着重要的影响, BDNF 能促进 A $\beta$  蛋白降解, 而 A $\beta$  蛋白的沉积又可下调 BDNF 的表达, 提示快速衰老小鼠铅暴露后, 在 SVZ 中 APP 和 *BDNF* mRNA 表达的变化可能存在一定的联系。

SVZ 是大脑神经发生的重要区域, 而研究显示神经发生与学习记忆能力相关, 星形胶质样细胞和神经母细胞是 SVZ 神经发生的功能细胞, 星形胶质样细胞是类似于神经干细胞的一种原始细胞<sup>[19-20]</sup>, 能够促进神经元存活、生长和迁移, 在神经细胞发育和损伤修复中都具有重要的意义, 而神经母细胞能沿着吻侧迁移流向嗅球分化成为新生神经元, 在迁移中与星形胶质样细胞相互作用, 参与受损的神经功能恢复。因此这两种细胞对脑组织神经细胞的修复、学习记忆功能的维持具有重要的意义。本研究发现: SAMR1+Pb 组小鼠 SVZ 中 DCX(+) / DAPI(+) 的细胞比率低于 SAMR1 组小鼠, 而未发现 GFAP(+) / DAPI(+) 的细胞比率有差异, 这与尹洁<sup>[21]</sup>的研究结果一致, 说明在单纯铅暴露时, 小鼠海马 GFAP(+) 细胞的表达尚未发生变化。但是 SAMP8 小鼠的 SVZ 中 DCX(+) / DAPI(+) 的细胞比率和 GFAP(+) / DAPI(+) 的细胞比率均明显低于 SAMR1 小鼠, 提示与同龄正常小鼠相比, 快速衰老小鼠已出现可观察的神经母细胞和星形胶质样细胞的丢失。SAMP8+Pb 组小鼠 SVZ 中



DCX(+)/DAPI(+ )的细胞比率和GFAP(+ )/DAPI(+ )的细胞比率明显低于SAMP8组小鼠,同样, *DCX*和*GFAP* mRNA的水平也明显下降。值得注意的是,在SAMP8小鼠铅暴露后,其SVZ区的GFAP(+ )/DAPI(+ )的细胞比率较SAMR1小鼠发生更明显的下降,这表明铅暴露可能主要是通过加剧SAMP8小鼠SVZ中星形胶质样细胞的损伤,从而参与铅暴露对SAMP8小鼠神经损伤的过程。

综上所述,铅暴露可导致快速衰老小鼠SVZ中APP表达增加和*BDNF* mRNA表达下降,同时加剧SVZ星形胶质样细胞丢失、逃避潜伏期延长、穿台次数下降,提示铅暴露能加剧快速衰老小鼠学习记忆能力的下降。但是,铅暴露后的快速衰老小鼠SVZ中APP的过表达和*BDNF* mRNA的表达水平下降对A $\beta$ 蛋白和BDNF的影响尚未明确,且A $\beta$ 蛋白和BDNF的表达变化是否与神经元母细胞和星形胶质样细胞损伤有关还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [ 1 ]黄辉. 发育早期铅暴露致食蟹猴阿尔茨海默病样作用及其对表观遗传修饰的影响[ D ]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [ 2 ]张荣. 醋酸铅对大鼠脑组织中神经营养因子及其受体表达的影响以及甲状腺激素调节作用的研究[ D ]. 石家庄: 河北医科大学, 2004.
- [ 3 ]陈晓珑, 王雯, 张楠, 等. 锌对铅暴露小鼠学习记忆及海马中BDNF表达的影响[ J ]. 工业卫生与职业病, 2013, 39( 3 ): 158-162.
- [ 4 ]Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease[ J ]. Nat Med, 2009, 15( 3 ): 331-337.
- [ 5 ]任丹, 杨伯宁, 葛晓东. 神经发生对小鼠学习记忆能力的影响[ J ]. 神经解剖学杂志, 2009, 25( 1 ): 74-78.
- [ 6 ]Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus[ J ]. Cell Tissue Res, 2008, 331( 1 ): 243-250.
- [ 7 ]刘钦. 母体孕期低水平铅暴露对子代学习记忆的影响及其与海马肾母细胞瘤过度表达基因关系的研究[ D ]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [ 8 ]杨惠芳. 职业紧张及铅负荷水平对工作能力评价的影响[ D ]. 成都: 四川大学, 2004.
- [ 9 ]Markowska AL, Spangler EL, Ingram DK. Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse( SAM P8 and R1 ) [ J ]. Physiol Behav, 1998, 64( 1 ): 15-26.
- [ 10 ]Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics[ J ]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43( 1 ): 545-584.
- [ 11 ]宋靖宇, 黎砚书, 陈英, 等. 铅暴露对大鼠海马组织APP和tau蛋白表达影响[ J ]. 中国公共卫生, 2016, 32( 6 ): 778-781.
- [ 12 ]薛振菲. 发育早期铅暴露对小鼠空间学习记忆能力和 $\beta$ -淀粉样前体蛋白表达的影响[ D ]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [ 13 ]Wu J, Basha MR, Brock B, et al. Alzheimer's disease ( AD )-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead( Pb ): evidence for a developmental origin and environmental link for AD[ J ]. J Neurosci, 2008, 28( 1 ): 3-9.
- [ 14 ]Ueda K, Shinohara S, Yagami T, et al. Amyloid  $\beta$  protein potentiates  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels: a possible involvement of free radicals[ J ]. J Neurochem, 1997, 68( 1 ): 265-271.
- [ 15 ]Kawahara M. Disruption of calcium homeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other conformational diseases[ J ]. Curr Alzheimer Res, 2004, 1( 2 ): 87-95.
- [ 16 ]Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, et al. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth[ J ]. Exp Neurol, 1997, 144( 2 ): 273-286.
- [ 17 ]Neal AP, Guilarte TR. MOLECULAR NEUROBIOLOGY OF LEAD(  $\text{Pb}^{2+}$  ): effects on synaptic function[ J ]. Mol Neurobiol, 2010, 42( 3 ): 151-160.
- [ 18 ]Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, et al. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease[ J ]. Mol Brain Res, 2000, 76( 2 ): 347-354.
- [ 19 ]Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain[ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96( 20 ): 11619-11624.
- [ 20 ]Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, et al. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain[ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97( 25 ): 13883-13888.
- [ 21 ]尹洁. 大鼠孕期低水平铅暴露对子代学习记忆能力的影响及其机理的研究[ D ]. 石家庄: 河北医科大学, 2008.

( 收稿日期: 2016-10-28; 录用日期: 2017-03-17 )

( 英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪, 陈姣; 校对: 汪源 )