

铅致大鼠海马神经发生的抑制作用

薛玲, 陈猛, 闫立成, 陈玮玮, 吴磊, 张艳淑

华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210

摘要:

[背景] 铅是一种常见的神经毒物, 长期低剂量铅暴露可造成神经系统损害。已有研究表明铅暴露可致神经细胞凋亡增加, 致使受损神经元细胞不能得到补偿, 进而影响大脑的正常功能。成年哺乳动物脑内海马齿状回颗粒下区 (SGZ) 终生存在有神经干细胞, 在某些生理或病理因素刺激下, 可增殖、分化为神经元和神经胶质细胞, 迁移到损伤的脑区替换受损细胞, 从而建立新的神经回路, 维护大脑的正常功能。研究发现, 干扰素 γ (IFN- γ) 可抑制神经干细胞的增殖及分化。转化生长因子 β (TGF- β) 也是调控细胞发育和细胞周期的关键分子, 可促进神经发生过程。

[目的] 初步探讨 IFN- γ 和 TGF- β 在铅致大鼠 SGZ 区神经发生损伤中的可能调控作用。

[方法] 雄性成年 Fisher 344 大鼠 45 只, 随机分为对照组、低铅暴露组、高铅暴露组。低铅暴露组和高铅暴露组大鼠分别饮用含有 300、600 mg/L 的醋酸铅溶液, 对照组大鼠饲以含有 600 mg/L 的醋酸钠溶液, 暴露时间为 9 周。应用 Morris 水迷宫试验检测大鼠空间学习和记忆能力; 以 Ki67+DCX+ 双标染色方法, 应用激光扫描共聚焦显微镜观察大鼠 SGZ 区神经干细胞增殖及分化情况。应用 real-time PCR 技术检测大鼠海马齿状回 (DG) 区 Ki67、DCX mRNA 的表达水平; 采用 ELISA 法检测大鼠海马 DG 区 IFN- γ 与 TGF- β 1 水平。

[结果] 高铅暴露组和低铅暴露组大鼠血铅水平分别为 (0.34±0.10)、(0.19±0.04) μ g/L, 均高于对照组 [(0.09±0.03) μ g/L]; 高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马 DG 区铅水平分别为 (0.53±0.06)、(0.48±0.08) μ g/g, 亦均高于对照组 [(0.40±0.05) μ g/g]。神经行为学试验检测结果显示, 高铅暴露组和低铅暴露组大鼠第 3 天逃避潜伏期分别为 (38.37±10.37)、(31.62±9.24) s, 均高于对照组 [(21.86±6.45) s], 且高铅暴露组大鼠逃避潜伏期高于低铅暴露组 ($P<0.05$)。高铅暴露组大鼠的平均穿越平台次数为 (2.13±0.92) 次, 低于对照组 [(4.27±1.16) 次]。铅暴露大鼠海马 CA1 区神经元细胞呈不同程度减少, 排列不规则, 可见鬼影细胞及固缩神经元细胞, 高铅暴露组损伤更为明显。高铅暴露组大鼠海马 DG 区 Ki67 和 DCX 的 mRNA 表达水平分别为 0.68±0.10 和 0.78±0.12, 均低于对照组 (均为 1.00±0.16); 高铅暴露组大鼠 SGZ 区 (Ki67+DCX+) /Ki67+ 值为对照组的 56.4% (20.87% vs. 37.00%), 亦低于低铅暴露组, 为其 61.2% (20.87% vs. 34.11%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马 DG 区 IFN- γ 水平 [分别为 (1.22±0.09)、(1.20±0.11) ng/mg (以蛋白计, 下同)], 均高于对照组 [(1.08±0.08) ng/mg], 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马 DG 区 TGF- β 1 表达水平分别为 (3.15±0.24)、(3.36±0.32) ng/mg, 均低于对照组 [(3.65±0.37) ng/mg], 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

[结论] 铅暴露可能导致 IFN- γ 水平升高, 进而抑制 TGF- β 1 的表达水平, 影响神经干细胞的分化, 致使铅暴露组大鼠新生神经元细胞减少。不能代偿受损神经细胞, 这可能是导致成年大鼠神经行为改变, 学习记忆能力下降的原因之一。

关键词: 铅; 神经发生; 海马; 干扰素 γ ; 转化生长因子 β 1

Neurogenesis impairment in hippocampus of rats induced by lead XUE Ling, CHEN Meng, YAN Li-cheng, CHEN Wei-wei, WU Lei, ZHANG Yan-shu (School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract:

[Background] Lead is a common neurotoxic substance, and long-term exposure to low-dose lead can cause damage to the nervous system. Previous studies have shown that lead exposure can increase the apoptosis of nerve cells, and damaged nerve cells can not be compensated, which in turn affects the normal function of the brain. In adult mammals, sub-granular zone

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19132

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;
E-mail: xuel_heuu@163.com

通信作者

张艳淑, E-mail: yanshu_zhang@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-03-12

录用日期 2019-06-03

文章编号 2095-9982(2019)08-0731-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

薛玲, 陈猛, 闫立成, 等. 铅致大鼠海马神经发生的抑制作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (8): 731-737.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19132

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Yan-shu, E-mail: yanshu_zhang@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-03-12

Accepted 2019-06-03

►To cite

XUE Ling, CHEN Meng, YAN Li-cheng, et al. Neurogenesis impairment in hippocampus of rats induced by lead[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(8): 731-737.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19132

(SGZ) eventually harbours neural stem cells. Under the stimulation of certain physiological or pathological factors, neural stem cells can proliferate and differentiate into neurons and glial cells, and migrate to damaged brain regions to replace damaged cells. Thus new neural circuits are established to maintain the normal functions of the brain. Studies have found that interferon- γ (IFN- γ) can inhibit the proliferation and differentiation of neural stem cells. Transforming growth factor- β (TGF- β) is also a key molecule regulating cell development and cell cycle, and promotes the process of neurogenesis.

[Objective] This experiment aims to explore the possible regulatory roles of IFN- γ and TGF- β 1 in lead-induced neurogenesis impairment in hippocampal SGZ of rats.

[Methods] Forty-five adult male Fisher 344 rats were randomly divided into control group, low-dose lead exposure group, and high-dose lead exposure group. Rats in the low-dose and high-dose lead exposure groups were given 300 mg/L and 600 mg/L lead acetate solution, respectively. Rats in the control group were treated with 600 mg/L sodium acetate solution. The exposure lasted for 9 weeks. Morris water maze test was applied to test the spatial learning and memory ability of the rats. The proliferation and differentiation of neural stem cells in SGZ were observed by laser scanning confocal microscopy with Ki67⁺-DCX⁺ staining. Real-time PCR was used to detect the expressions of *Ki67* and *DCX* mRNA in hippocampal dentate gyrus (DG) region of rats. ELISA assay was used to detect the levels of IFN- γ and TGF- β 1 in the hippocampal DG of rats.

[Results] The blood lead levels in the high-dose and low-dose lead exposure groups were $(0.34 \pm 0.10) \mu\text{g/L}$ and $(0.19 \pm 0.04) \mu\text{g/L}$, respectively, which were higher than that in the control group $[(0.09 \pm 0.03) \mu\text{g/L}]$. The lead levels in the hippocampal DG area in the high-dose and low-dose lead exposure groups were $(0.53 \pm 0.06) \mu\text{g/g}$ and $(0.48 \pm 0.08) \mu\text{g/g}$, respectively, which were also higher than that in the control group $[(0.40 \pm 0.05) \mu\text{g/g}]$. The neurobehavioral test showed that the escape latencies in the high-dose and low-dose lead exposure groups were $(38.37 \pm 10.37) \text{s}$ and $(31.62 \pm 9.24) \text{s}$, respectively, which were higher than that in the control group $[(21.86 \pm 6.45) \text{s}]$, and the escape latency in the high-dose lead group was higher than that in the low-dose group ($P < 0.05$). The average number of crossing platforms in the high-dose lead exposure group was (2.13 ± 0.92) times, which was lower than that in the control group $[(4.27 \pm 1.16) \text{times}]$. The neurons in the hippocampal CA1 area of lead-exposed rats decreased in varying degrees, the arrangement was irregular, and ghost cells and stenotic neurons were observed, especially in the high-dose lead exposure group. The mRNA expression levels of *Ki67* and *DCX* in hippocampal DG region in high-dose lead exposure group were 0.68 ± 0.10 and 0.78 ± 0.12 , respectively, which were lower than the levels in the control group (both were 1.00 ± 0.16). The ratio of SGZ (Ki67⁺-DCX⁺)/Ki67⁺ in the high-dose lead exposure group was 56.4% (20.87% vs. 37.00%) in the control group, and it was also lower than the low-dose lead exposure group, which was 61.2% (20.87% vs. 34.11%), showing significant difference ($P < 0.05$). The expression level of IFN- γ in hippocampal DG area of rats with high-dose lead exposure and low-dose lead exposure were $[(1.22 \pm 0.09) \text{ng/mg}]$ (in terms of protein, thereafter) and $(1.20 \pm 0.11) \text{ng/mg}$, which were higher than the level of the control group $[(1.08 \pm 0.08) \text{ng/mg}]$, showing significant difference ($P < 0.05$). The expression levels of TGF- β 1 in hippocampal DG of the high-dose and low-dose lead exposure groups were $(3.15 \pm 0.24) \text{ng/mg}$ and $(3.36 \pm 0.32) \text{ng/mg}$, respectively, which were lower than that of the control group $[(3.65 \pm 0.37) \text{ng/mg}]$, showing significant difference ($P < 0.05$).

[Conclusion] Lead exposure may increase the level of IFN- γ , inhibit the expression level of TGF- β 1, affect the differentiation of neural stem cells, and result in the decrease of newborn neurons in lead exposure rats. The damaged neurons can not be compensated, which may be the reason for the decline of learning and memory ability in adult rats with neurobehavioral changes.

Keywords: lead; neurogenesis; hippocampus; interferon- γ ; transforming growth factor- β 1

铅是一种环境重金属神经毒物,长期低剂量铅暴露可造成神经系统损害,由其带来的健康威胁一直是公共卫生领域的关注热点。铅致神经系统损伤的机制众说纷纭,现有研究提示,铅可通过诱导神经递质释放,影响突触可塑性,激发氧化应激反应,诱导神经元凋亡,增加血脑屏障/血脑脊液屏障的通透性,干扰钙离子稳态,导致脑内炎性微环境失衡等致使神经系统损伤。海马神经元细胞对铅的毒性非常敏感,铅暴露可致神经细胞凋亡增加,进而影响大脑的正常功能^[1]。既往认为神经细胞损伤后不可再生,目前已知成年哺乳动物大脑侧脑室下区(sub-ventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒下区(sub-granular zone, SGZ)终生存在有神经发生功能的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)^[2]。在某些生理或病理因素刺激下,NSCs可以增殖并分化为神经元和神经胶质细胞,迁移到损

伤的脑区替换受损细胞,从而建立新的神经回路,维护大脑的正常功能^[3],该过程亦被称为神经发生,成年小鼠的学习记忆能力与神经发生具有一定的相关性^[4]。NSCs通常处于静息状态,当脑内微环境发生改变时可被激活,微环境中的细胞因子对NSCs的增殖能力和分化方向有重要影响^[5-6]。研究发现,干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)是细胞因子超家族中一个糖蛋白类同源细胞因子家族成员,可抑制NSCs的增殖,促进其向神经细胞分化^[7-9]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种多功能蛋白质,不仅是一种抗炎细胞因子,也是调控细胞发育和细胞周期的关键分子^[10]。体内实验也证实,TGF- β 可促进神经发生,促进NSCs向神经细胞及神经胶质细胞的分化^[11]。本研究通过动物实验,观察慢性铅暴露对实验大鼠海马神经发生的影响,及探讨IFN- γ 和TGF- β 1对海马

SGZ 区神经发生的可能调控作用, 从而为铅致神经损伤的机制研究提供新的思路, 期望能够为诊断和治疗神经损伤提供更精确的依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

雄性健康成年 SPF 级 Fisher 344 大鼠 45 只, 体重 (277.72 ± 18.28) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [动物合格证号: SCXK (京) 2011-0009]。实验前, 温度 $20 \sim 26^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\% \sim 60\%$, 光照 12 h, 适应性饲养一周, 期间大鼠自由饮食饮水。一周后, 将大鼠按体重相近者随机分为对照组、低铅暴露组、高铅暴露组, 每组 15 只。低铅暴露组和高铅暴露组大鼠分别饮用含有 300 mg/L 和 600 mg/L 的醋酸铅溶液, 对照组大鼠饲以含有 600 mg/L 的醋酸钠溶液^[12-14]; 暴露时间为 9 周^[15-17]。本实验由华北理工大学动物保护福利委员会批准执行 (许可证编号: 2013-004)。

1.2 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), Ki67 一抗 (Sigma, 德国), DCX 一抗、山羊抗兔和山羊抗大鼠二抗 (Abcam, 英国), 大鼠 IFN- γ 及 TGF- β 1 ELISA 试剂盒 (浙江联科生物技术有限公司, 中国)。冰冻切片机 CM1950 (Leica 冰冻切片机, 德国), 激光扫描共聚焦显微镜 FV1000 (Olympus, 日本), 多功能酶标仪 Spectra Max MS (Molecular Devices, 美国) 用于神经发生的观察, 应用 Roche LightCycler96 型荧光定量 PCR 仪 (瑞士) 进行 mRNA 的检测, 应用 Morris 水迷宫 (安徽正华生物仪器设备有限公司, 中国) 进行神经行为测试。

1.3 大鼠空间学习和记忆能力的检测

应用 Morris 水迷宫试验测试大鼠对空间位置和方向的学习记忆能力, 前 3 天为定位航行试验, 用于测量大鼠空间学习能力。每天于固定时间进行 4 次试验, 每次试验分别将大鼠从 I、II、III、IV 四个象限不同的入水点面向池壁放入直径 160 cm、高 50 cm 的水池水中, 应用录像系统自动记录大鼠找到平台的时间 (逃避潜伏期) 和游泳路径。大鼠找到平台后或 120 s 内未找到平台的大鼠, 由实验者引导到平台 (逃避潜伏期记为 120 s), 并在平台滞留 20 s, 在另三个象限重复此过程。第 4 天为空间探索试验, 移除平台, 任意选择一个象限的入水点将大鼠放入水中, 记录其在 120 s 内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^[18-19]。

1.4 样本的采集

神经行为学测试结束后, 每组随机留取 3 只大鼠用于脑组织病理变化的观察, 另每组再各随机留取 3 只大鼠用于神经干细胞增殖及分化的观察。其余大鼠经 10% 水合氯醛麻醉后, 采取腹主动脉取血的方式收集血液置于抗凝采血管中, -80°C 保存待测。大鼠采血后断头处死, 于冰上迅速剥离海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 区组织, 部分置于 EP 管中, -80°C 保存待测; 部分置于装有 Trizol 的无酶 EP 管中, -80°C 冻存用于 RNA 的提取。

1.5 大鼠血液及脑组织中铅含量的检测

应用微波消解法处理血液及海马 SGZ 区脑组织, 应用 7500a 型电感耦合等离子质谱仪 (ICP-MS) 进行血液及脑组织铅含量的测定。铅的检出限为 $0.028 \mu\text{g/L}$, 回收率为 $103.19\% \sim 107.21\%$, RSD 为 $1.50\% \sim 3.40\%$ 。

1.6 大鼠脑组织病理变化的观察

脑组织病理学观察留用的大鼠采用 10% 水合氯醛麻醉后, 经心脏灌注生理盐水, 断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 经过乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋后, 用冰冻切片机切成 $5 \mu\text{m}$ 的切片, 经烘干、脱蜡后, HE 染色并观察实验大鼠海马组织 CA1 区神经细胞的变化。

1.7 大鼠 SGZ 区神经干细胞增殖及分化情况的观察

用于神经干细胞增殖及分化观察 (免疫荧光法) 的大鼠采用 10% 水合氯醛麻醉, 经心脏灌注内固定后, 快速剥离全脑组织, 经 4% 多聚甲醛固定过夜, 置于 30% 蔗糖中脱水, 整脑下沉 2~3 d 后取出, 滤纸吸干水分, OCT 包埋, -80°C 冻存后, 用冰冻切片机切成 $30 \mu\text{m}$ 的切片, 用 0.01% PBS 洗涤 30 min, 0.4% Triton X100 透化 1 h, 再用 1% BSA 室温下封闭 1 h。然后以 Ki67 (1:50) + DCX (1:1000) 作为一抗, 4°C 孵育过夜。用 0.1% Triton X100 洗涤 3 次, 每次 15 min, 滴加荧光素标记的二抗 (稀释比例 1:200), 室温避光孵育 1.5 h 后, 用 DAPI ($1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 复染, 甘油封片, 于激光扫描共聚焦显微镜 (LCSM) 下 (Olympus FV1000, 软件 FV10-ASW 1.5 Viewer) 扫描观察海马 SGZ 区 DCX 和 Ki67 的表达情况, 应用 Image J 软件对新生神经元细胞的计数进行分析。

1.8 大鼠 SVZ 区和海马 DG 区组织中 Ki67、DCX mRNA 表达水平的检测

使用超声匀浆器将无酶 EP 管中的脑组织裂解, 取上清, 提取总 mRNA, 并进行 mRNA 浓度和纯度的检测。然后以 β -actin 为内参, 应用 Roche Light Cycler® 96

实时荧光定量PCR仪进行扩增,选择SYBR Green法对不同组织中的*Ki67*、*DCX*的mRNA表达水平进行检测。Real-time PCR反应体系为20 μ L,其中cDNA 2 μ L,上下游引物(10 μ mol)各1 μ L,SYBR Green I 10 μ L,超纯水6 μ L;real-time PCR反应条件为预温95 $^{\circ}$ C 10 min;共扩增40个循环,其中每个循环95 $^{\circ}$ C 10 s,65 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 10 s;熔解95 $^{\circ}$ C 10 s,65 $^{\circ}$ C 60 s。引物名称及序列如下:*DCX*上游引物为GCAGTCAGCTCTCAACACCT,下游引物为CCTTGTTGGTCACTTGAGCG;*Ki67*上游引物为CCTGCCCGACCTACAAAAT,下游引物为AAAATCTCTGAGGCGGTGGG。

1.9 大鼠海马DG区IFN- γ 和TGF- β 1水平的检测

将上述冻存的海马DG区组织称重后放入1.5 mL EP管置于冰上,以1:9比例加入超纯水,剪碎,匀浆,离心10 min后,取上清;采用BCA法对海马DG区组织上清液中的总蛋白进行定量。应用杭州联科生物技术股份有限公司提供的大鼠IFN- γ 与TGF- β 1 ELISA试剂盒对实验大鼠海马DG区组织IFN- γ 与TGF- β 1含量进行测定。

1.10 统计学分析

应用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计分析。服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间均数比较采用单因素方差分析,重复测量数据采用重复测量的方差分析;两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

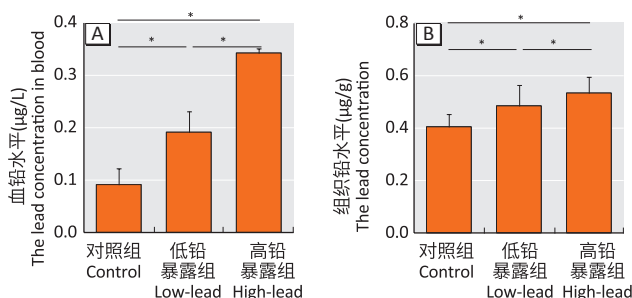
2.1 大鼠血液及海马DG区脑组织铅水平

分析结果显示,铅暴露大鼠血铅水平均高于对照组[(0.09 $\pm$ 0.03) μ g/L],高铅暴露组大鼠血铅水平[(0.34 $\pm$ 0.01) μ g/L]亦高于低铅暴露组[(0.19 $\pm$ 0.04) μ g/L],均 $P<0.05$ 。高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马DG区脑组织铅的水平分别为(0.53 $\pm$ 0.06)、(0.48 $\pm$ 0.08) μ g/g,均高于对照组[(0.40 $\pm$ 0.05) μ g/g],差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

2.2 大鼠学习记忆能力

在Morris水迷宫定位航行试验中,经重复测量方差分析发现:随着训练天数的延长,同一组别大鼠不同时间点定位航行试验逃避潜伏期均逐渐缩短($P<0.05$);与对照组相比,铅暴露组大鼠第3天的逃避潜伏期明显增加,且高铅暴露组大鼠逃避潜伏期长于低铅暴露组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。空间探索试验结果提示,高铅暴露组大鼠的平均穿越平台次数

低于对照组和低铅暴露组($P<0.05$);低铅暴露组大鼠平均穿越平台次数与对照组差异无统计学意义,见表1。不同组别大鼠游泳速度比较,差异无统计学意义。大鼠第3天的运动轨迹清晰,如图2所示,高铅暴露组大鼠游泳行程长于对照组,亦长于低铅暴露组。



[注]*:为两组比较, $P<0.05$ 。

[Note]*: Comparison between two groups, $P<0.05$.

图1 大鼠血液(A)及海马DG区脑组织(B)铅水平

($n_{\text{血液}}=15$; $n_{\text{海马DG区}}=9$)

Figure 1 The lead concentration in blood (A) and hippocampal DG (B) of rats

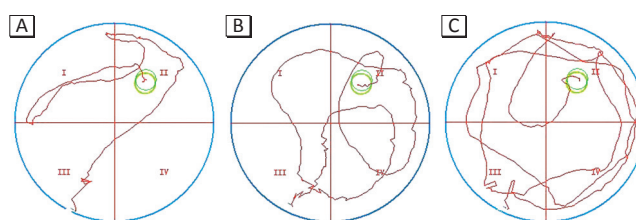
表1 铅暴露对大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

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

组别 Group	潜伏期 (s) Escape latency			穿台次数 (次) Frequency of crossing the platform
	第一天 Day 1	第二天 Day 2	第三天 Day 3	
对照组 Control group	69.82 $\pm$ 12.74	39.76 $\pm$ 16.72	21.86 $\pm$ 6.45	4.60 $\pm$ 1.35
低铅暴露组 Low-lead exposure group	74.07 $\pm$ 20.18	44.33 $\pm$ 15.68	31.62 $\pm$ 9.24 ^a	4.27 $\pm$ 1.16
高铅暴露组 High-lead exposure group	74.19 $\pm$ 18.34	48.23 $\pm$ 20.07	38.37 $\pm$ 10.37 ^{ab}	2.13 $\pm$ 0.92 ^{ab}

[注] a:与对照组比较, $P<0.05$; b:与低铅暴露组比较, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with control group, $P<0.05$; b: Compared with Low-lead exposure group, $P<0.05$.



[注] A:对照组; B:低铅暴露组; C:高铅暴露组。

[Note] A: Control; B: Low-lead; C: High-lead.

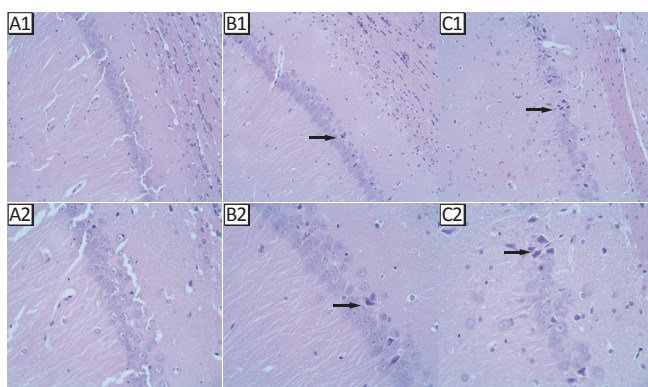
图2 水迷宫检测第3天游泳轨迹图

Figure 2 The swimming track of rats on the third day in water maze test

2.3 大鼠海马神经元细胞的变化

图3显示,经HE染色观察实验大鼠海马组织发现,对照组海马CA1区神经元细胞层次分明,排列整齐紧密,细胞质均质红染,核仁清晰;铅暴露大鼠海马CA1区神经元细胞呈不同程度减少,排列不规则,

散乱，核质不均匀，核周间隙增大，可见数量不等的梭形或三角形细胞，深染，鬼影细胞明显增多(图3B、C箭头所指)；有的细胞呈空泡状，甚至可见固缩神经元细胞，高铅暴露组更为明显。



[注] A：对照组；B：低铅暴露组；C：高铅暴露组。1：×200；2：×400。箭头所指为鬼影细胞。

[Note] A: Control; B: Low-lead; C: High-lead. 1: ×200; 2: ×400. The arrow indicates ghost cells.

图3 铅暴露对大鼠海马CA1区神经元细胞的损伤情况

Figure 3 The damage of neurons in hippocampal CA1 of rats following lead exposure

2.4 大鼠SGZ区神经发生的变化

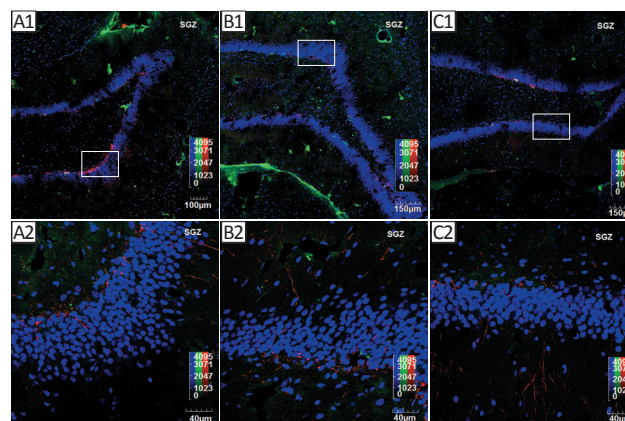
图4(1为低倍图，×400；2为1中方框部分高倍图，×1000)显示，高铅暴露组大鼠海马SGZ区可见少量($Ki67^+-DCX^+$)细胞(指 $Ki67^+$ 与 DCX^+ 双标阳性细胞)，其表达低于对照组和低铅暴露组；未发现低铅暴露组大鼠SGZ区($Ki67^+-DCX^+$)细胞表达与对照组有差异。分析实验大鼠SGZ区($Ki67^+-DCX^+$)细胞数占 $Ki67^+$ 细胞数的比率发现，高铅暴露组大鼠SGZ区($Ki67^+-DCX^+$)/ $Ki67^+$ 值明显降低，为对照组的56.4%(20.87%/37.00%)，为低铅暴露组的61.2%(20.87%/34.11%)，差异有统计学意义($P<0.05$)。

进一步对实验大鼠海马DG区 $Ki67$ 、 DCX mRNA的表达水平进行检测发现：与对照组相比，高铅暴露组大鼠 $Ki67$ 和 DCX mRNA的表达水平均低于对照组，未发现低铅暴露组大鼠 $Ki67$ 和 DCX mRNA的表达与对照组比较有差异。见表2。

2.5 大鼠海马DG区IFN- γ 与TGF- $\beta 1$ 的表达水平

由图5可知，高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马DG区IFN- γ 表达水平[分别为(1.22±0.09) ng/mg(均以蛋白计，后同)和(1.20±0.11) ng/mg]高于对照组[(1.08±0.08) ng/mg]，差异有统计学意义($P<0.05$)。高铅暴露组和低铅暴露组大鼠海马DG区TGF- $\beta 1$ 表达水平[分别为(3.15±0.24)、(3.36±0.32) ng/mg]均低

于对照组[(3.65±0.37) ng/mg]，分别较对照组降低了13.7%和7.9%。通过相关分析，IFN- γ 与TGF- $\beta 1$ 水平呈负相关($r=-0.609$, $P=0.01$)。



[注] A：对照组；B：低铅暴露组；C：高铅暴露组。1：×400；2：1中方框部分，×1000。DCX：红色；Ki67：绿色；DAPI：蓝色。

[Note] A: Control; B: Low-lead; C: High-lead. 1: ×400; 2: Box in 1, ×1000.

DCX: Red; Ki67: Green; DAPI: Blue.

图4 铅暴露对大鼠SGZ神经发生的影响

Figure 4 The effects on neurogenesis in SGZ of rats following lead exposure

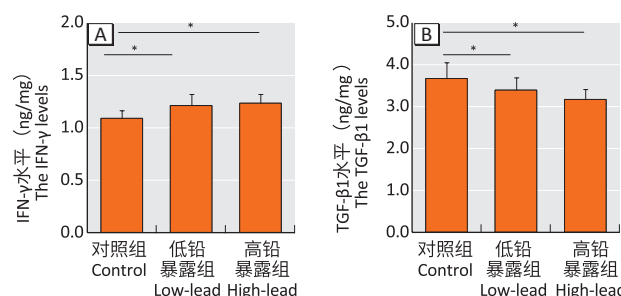
表2 铅暴露大鼠海马DG区神经发生相关因子mRNA的表达($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 2 The mRNA expression of neurogenesis related factor in hippocampal DG of rats following lead exposure

组别 (Group)	$Ki67$	DCX
对照组 (Control group)	1.00±0.16	1.00±0.16
低铅暴露组 (Low-lead exposure group)	0.86±0.15	0.86±0.13
高铅暴露组 (High-lead exposure group)	0.68±0.10 ^a	0.78±0.12 ^a

[注] a：与对照组比较， $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with control group, $P<0.05$.



[注] *：为两组比较， $P<0.05$ 。

[Note] *: Comparison between two groups, $P<0.05$.

图5 铅暴露对大鼠海马DG区IFN- γ (A) 与TGF- $\beta 1$ (B) 表达水平的影响 ($n=9$)

Figure 5 The IFN- γ (A) and TGF- $\beta 1$ (B) levels in hippocampal DG of rats following lead exposure

3 讨论

成年哺乳动物脑内神经发生现象的存在，打破了“成年脑内不存在神经元再生”这一神经科学领域的

百年教条^[20],神经发生受损亦是影响大脑正常神经功能状态的原因之一。大脑皮层和海马回是铅神经毒作用的主要靶点,且海马与高级认知功能密切相关,是学习记忆、智力的关键解剖学部位^[21]。本研究结果显示,铅暴露组大鼠第3天的逃避潜伏期明显长于对照组,且高铅暴露组大鼠平均穿台次数较对照组也明显下降,这与本课题组前期的研究结果一致^[22-23]。

进一步观察铅对脑组织形态结构的影响发现,海马CA1区神经元细胞数量及形态损伤情况与铅的暴露剂量密切相关,高铅暴露组大鼠海马CA1区神经元细胞损伤程度更为明显,与Li等^[24]的研究结果一致,说明铅暴露导致了实验大鼠海马神经元细胞受损、失代偿,进而引起学习记忆能力的损伤。以往认为神经元细胞损伤后不可代偿,而神经细胞存在再生功能的结论已被证实,受损的神经元或神经胶质细胞可以通过神经干细胞的增殖与分化,产生新的神经元和胶质细胞,逆转受损的大脑功能状态,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。本研究通过对海马SGZ区神经发生的观察发现,高铅暴露组大鼠SGZ区新生神经元细胞的表达量低于对照组,说明铅暴露可能抑制了SGZ区的神经发生过程,致使新生神经元细胞数目减少,而无法弥补受损区域神经元的损失,导致大脑功能损伤,学习记忆能力下降,出现退行性病变样症状。邢栋的研究^[25]也显示:铅暴露显著降低大鼠海马DG区新生神经元数目。

神经发生受脑内微环境的影响,其中细胞因子对神经干细胞增殖与分化有着重要影响,近些年来,炎症因子作为研究热点成为铅致神经损伤机制研究的主要靶点之一^[26]。既往研究结果提示,IFN- γ 在神经发生和神经系统功能修复的过程中表现出多种潜能^[7],它以配体-受体特异性结合的方式,激活Shh或JNK信号通路,抑制大脑皮层神经元的增殖,或诱导神经干细胞分化^[8, 27-28]。TGF- β 1也是细胞发育和细胞周期的关键调节分子之一,在细胞增殖与分化过程中发挥生物学效应^[29]。体内研究提示TGF- β 1可促进NSCs向神经元细胞和神经胶质细胞分化,进而调控神经发生过程^[30]。本研究发现,铅暴露大鼠海马DG区IFN- γ 水平高于对照组,而TGF- β 1表达水平低于对照组,提示IFN- γ 与TGF- β 1可能在铅致神经损伤,甚或神经发生过程中发挥着一定作用。Xiao等^[31]的研究结果提示IFN- γ 和TGF- β 对细胞的增殖功能具有拮抗作用,TGF- β 1通过激活转录因子Smad2和Smad3

而完成其信号转导作用,而IFN- γ 受体及其结合的蛋白质酪氨酸激酶Jak1能介导Stat1的磷酸化和活化。Ulloa^[32]认为TGF- β 和IFN- γ 的信号可以整合,其基础是:IFN- γ 抑制TGF- β 诱导的Smad3的磷酸化,进而Smad3在细胞核内积聚以及TGF- β 应答元件的活化;IFN- γ 通过Jak1和Stat1作用来诱导Smad7的表达,拮抗Smad3,从而阻止Smad3与TGF- β 1受体的相互作用。说明IFN- γ 参与的STAT通路和TGF- β 参与的SMAD转导通路之间存在反式调控的机制^[33]。本研究也发现IFN- γ 与TGF- β 1水平呈负相关,结果与张晓玲^[34]的研究结果相吻合。虽然本研究结果仅显示了IFN- γ 与TGF- β 1的相关关系,但为后期对二者因果关系及其调控机制的探讨和验证提供了参考依据。

本研究发现铅暴露致使IFN- γ 水平升高,而TGF- β 1的水平呈下降趋势,可能是IFN- γ 抑制了TGF- β 1的表达,进而影响了神经干细胞的分化,导致铅暴露组大鼠新生神经元细胞减少,不能代偿受损神经细胞,最终导致成年大鼠学习记忆能力下降。该研究结果可为铅致神经损伤的机制研究提供新的思路。由于本研究设计时仅考虑了剂量对神经发生在铅致神经损伤中的影响,而忽略了时间在其中的作用,故尚有不足之处,接下来我们将按照时间或剂量效应关系对课题进行深入的研究,探讨神经发生对神经损伤的作用。

参考文献

- [1] 严伟伟,贾仰民,韩静茵,等. 铅暴露对小鼠学习记忆能力的影响及机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(1): 21-23.
- [2] 姜春莲,汪艳璐,罗玉萍. 成年哺乳动物神经发生的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(5): 107-112.
- [3] COLANGELO AM, CIRILLO G, ALBERGHINA L, et al. Neural plasticity and adult neurogenesis: the deep biology perspective[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(2): 201-205.
- [4] 李明,李建忠,吴海平,等. SAMP8小鼠记忆能力与海马CA1区神经元脱失相关性研究[J]. 四川解剖学杂志, 2017, 25(2): 1-4.
- [5] EHNINGER D, KEMPERMANN G. Neurogenesis in the adult hippocampus[J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 243-250.
- [6] ZHANG P, LI J, LIU Y, et al. Human embryonic neural stem cell transplantation increases subventricular zone cell proliferation and promotes peri-infarct angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. Neuropathology, 2011, 31

- (4): 384-391.
- [7] 郑福祥, 许云龙, 何芬, 等. Wnt7a 蛋白在 IFN- γ 促神经干细胞增殖中的影响 [J]. 解剖学研究, 2017, 39 (2): 145-148, 101.
- [8] HU S, ROTSCHAFER JH, LOKENSGARD JR, et al. Activated CD8⁺ T lymphocytes inhibit neural stem/progenitor cell proliferation: role of interferon-gamma [J]. PLoS One, 2014, 9 (8): e105219.
- [9] LUM M, CROZE E, WAGNER C, et al. Inhibition of neurosphere proliferation by IFN γ but not IFN β is coupled to neuronal differentiation [J]. J Neuroimmunol, 2009, 206 (1/2): 32-38.
- [10] 王秋实, 李平. TGF- β 1 受体 1 和 2 在 TGF- β 1 调节细胞增殖中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33 (2): 122-127.
- [11] 张馨月, 李洪鹏. 中枢神经损伤后 TGF- β 1 信号通路对神经再生的影响 [J]. 解剖科学进展, 2017 (6): 653-655.
- [12] 冯昶, 范广勤, 黎砚书, 等. 长期铅暴露致大鼠神经退行性改变 [C] // 中国毒理学会第六届全国毒理学大会论文摘要. 广州: 中国毒理学会, 2013.
- [13] 李爽, 何滨, 王丽媛, 等. 铅暴露大鼠海马铜结合蛋白组学研究 [C] // 2016 中国毒理学会神经毒理专业委员会学术年会论文集. 北京: 中国毒理学会, 2016.
- [14] 任清风, 李炜娟, 徐群英, 等. 饮水铅暴露对大鼠脑组织 APE1 表达的影响及与氧化应激的关系研究 [J]. 天津医药, 2016, 44 (2): 170-173.
- [15] 田凯琦. 铜蛋白组在铅致大鼠海马神经损伤中的作用研究 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2016.
- [16] 薛玲, 蒋守芳, 冯佩佩, 等. 铅暴露致血脑脊液屏障功能影响的实验研究 [C] // 中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集. 武汉: 中国毒理学会, 2015.
- [17] 梁瑞峰, 李伟庆, 牛侨. 亚慢性铝暴露对大鼠认知能力及大脑皮质 β -分泌酶-1 表达的影响 [J]. 中国药物与临床, 2012, 12 (5): 571-573.
- [18] 封敏, 卢圣锋, 张承舜, 等. 国内大鼠 Morris 水迷宫实验现状与分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38 (11): 2170-2172.
- [19] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用 [J]. 神经药理学报, 2014, 4 (5): 30-35.
- [20] 刘伟, 吴浩, 许鹏程. 成年哺乳动物海马齿状回神经发生的研究进展 [J]. 山东医药, 2011, 51 (9): 111-113.
- [21] 陈景元. 环境铅暴露致脑发育损伤的机制 [C] // 中国毒理学会全国毒理学大会论文摘要. 广州: 中国毒理学会, 2013.
- [22] 薛玲, 李政垚, 张可欣, 等. 铅暴露对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (7): 586-592.
- [23] 吴磊, 何滨, 魏静, 等. 铅和高脂饮食对雄性大鼠学习记忆及海马炎症因子的影响 [J]. 中国职业医学, 2017, 44 (2): 148-152.
- [24] LI F, YAN CQ, LIN LT, et al. Acupuncture attenuates cognitive deficits and increases pyramidal neuron number in hippocampal CA1 area of vascular dementia rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 133.
- [25] 邢栋, 刘志华, 何慧明, 等. 铅通过 Wnt 信号通路损伤发育期大鼠海马 DG 区神经再生的研究 [J]. 合肥工业大学学报 (自然科学版), 2018, 41 (5): 698-702.
- [26] 苏鹏. NLRP3 在铅暴露诱导神经炎症反应中的作用及机制 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [27] SUN L, TIAN ZZ, WANG JP. A direct cross-talk between interferon- γ and sonic hedgehog signaling that leads to the proliferation of neuronal precursor cells [J]. Brain Behav Immun, 2010, 24 (2): 220-228.
- [28] DONNELLY JM, CHAWLA A, HOUGHTON JM, et al. Sonic hedgehog mediates the proliferation and recruitment of transformed mesenchymal stem cells to the stomach [J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e75225.
- [29] 唐芳兰, 王艳, 高卓. TGF- β 1/Smads 信号转导通路在多种疾病中的作用机制 [J]. 中国生育健康杂志, 2015, 26 (5): 481-484.
- [30] DIAS JM, ALEKSEENKO Z, APPLEQUIST JM, et al. Tgf β signaling regulates temporal neurogenesis and potency of neural stem cells in the CNS [J]. Neuron, 2014, 84 (5): 927-939.
- [31] XIAO BG, ZHANG GX, MA CG, et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN- γ) [J]. Clin Exp Immunol, 1996, 103 (3): 475-481.
- [32] ULLOA L, DOODY J, MASSAGUÉ J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway [J]. Nature, 1999, 397 (6721): 710-713.
- [33] 汪高航. STAT3 抑制 TGF- β 信号通路的分子机制 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [34] 张晓玲. 特发性肺纤维化患者血清 TGF- β 、IFN- γ 水平变化的意义 [J]. 中国医学创新, 2018, 15 (6): 137-140.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源, 宋琪; 校对: 丁瑾瑜)