原创精选
Selected article

慢性醋酸铅染毒对小鼠焦虑样行为和血清代谢组学的影响及相关关系研究

李韵婷，朱嘉伟，许永杰，刘安飞，周芹，孟晓静

南方医科大学 a. 公共卫生学院职业卫生与职业医学系 b. 广东省热带病研究重点实验室，广东 广州 510515

DOI 10.11836/JEOM21326

摘要：

[背景] 长期低浓度接触铅可损害中枢神经系统，引起焦虑样行为，这一过程与血清代谢物改变的关系尚不清楚。

[目的] 探究不同剂量慢性醋酸铅（PbAc）暴露对小鼠焦虑样行为及血清代谢物的影响，从代谢组学角度探讨铅暴露对小鼠神经行为损伤的作用机制。

[方法] 4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠共 64 只，雌雄各半。小鼠根据性别随机分为 4 组，每组 16 只：对照组（正常饮水）、20 mg·L^{-1} PbAc 组、100 mg·L^{-1} PbAc 组、500 mg·L^{-1} PbAc 组。小鼠自由饮用含不同浓度 PbAc 水 10 周后，采用旷场实验检测小鼠焦虑样行为改变。麻醉小鼠后摘眼球取血，分离血清，采用液相色谱-质谱联用技术结合主成分分析和偏最小二乘判别分析比较不同剂量铅暴露对小鼠血清中代谢物的影响。对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析，并且对差异代谢物与行为学指标进行相关性分析。

[结果] 旷场实验结果显示，与对照组比较，100 mg·L^{-1} 和 500 mg·L^{-1} PbAc 组在中心区域运动时间减少，500 mg·L^{-1} PbAc 组中心区域穿越次数减少，100 mg·L^{-1} 和 500 mg·L^{-1} PbAc 组排便次数增加（$P<0.05$）。在正离子和负离子模式下，与对照组比较，20 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 157 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 80 种，下调的差异代谢物 77 种；100 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 172 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 57 种，下调的差异代谢物 115 种；500 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 119 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 42 种，下调的差异代谢物 77 种。对差异代谢物进行 KEGG 富集分析，发现代谢通路的改变主要涉及初级胆汁酸的生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢。差异代谢物中，炔诺酮与中心区域穿越次数呈正相关（r=0.406，$P<0.05$），二氢胸腺嘧啶与中心区域穿越次数呈负相关（r=–0.346，$P<0.05$），溶血磷脂酰胆碱 22∶1 和溶血磷脂 14∶0 与中心区域停留时间呈负相关（r=–0.429，$P<0.05$；r=–0.374，$P<0.05$）。

[结论] 慢性铅暴露可引起小鼠焦虑样行为，这种行为改变与血清中代谢产物改变相关，差异代谢物主要富集到初级胆汁酸生物合成、胆汁酸分泌和胆固醇代谢通路。

关键词：铅；神经毒性；焦虑样行为；血清代谢物；代谢组学

Effects of chronic lead acetate exposure on neurobehavior and serum metabolomics in mice

LI Yunting, ZHU Jiawei, XU Yongjie, LIU Anfei, ZHOU Qin, MENG Xiaojing (a. Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health b. Guangdong Province Key Laboratory of Tropical Disease Research, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract:

[Background] Chronic low-level exposure to lead can damage the central nervous system and cause anxiety-like behavior. However, whether changes of blood metabolites occur in this process and its relationship with lead-induced neurobehavioral disorder remain unclear.

[Objective] To explore the effects of chronic lead acetate (PbAc) exposure at different concentrations on anxiety-like behavior and serum metabolites and their relationships in mice, as well as the mechanism of lead exposure on neurobehavioral injury in mice from the

基金项目
国家自然科学基金（81973071，81773473）

作者简介
李韵婷（1995—），女，硕士生；
E-mail：1482905252@qq.com

通信作者
孟晓静，E-mail：xiaojingmeng@smu.edu.cn

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2021-07-25
录用日期 2022-01-07

文章编号 2095-9982(2022)02-0133-08
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
李韵婷，朱嘉伟，许永杰，等. 慢性醋酸铅染毒对小鼠焦虑样行为和血清代谢组学的影响及相关关系研究 [J]. 环境与职业医学，2022，39（2）：133-140.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21326

Funding
This study was funded.

Correspondence to
MENG Xiaojing, E-mail: xiaojingmeng@smu.edu.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2021-07-25
Accepted 2022-01-07

▸ To cite
LI Yunting, ZHU Jiawei, XU Yongjie, et al. Effects of chronic lead acetate exposure on neurobehavior and serum metabolomics in mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(2): 133-140.

▸ Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21326

perspective of metabolomics.

[Methods] A total of 64 healthy 4-week-old C57BL/6J mice, half male and half female, were randomly divided into four groups: control group (normal drinking water), 20 mg·L^{-1} PbAc group, 100 mg·L^{-1} PbAc group, and 500 mg·L^{-1} PbAc group. After 10 weeks of free drinking of water containing designed concentrations of PbAc, the mice were tested for anxiety-like behavioral changes by open field experiment. After the mice were anesthetized, blood was collected from the eyes, the serum was separated, and the effects of designed doses of lead exposure on metabolites in the serum of mice were compared by liquid chromatography with tandem mass spectrometry combined with principal component analysis and partial least squares discrimination analysis.

[Results] The results of the open field experiment showed that the reductions in movement time spent in central area in the 100 mg·L^{-1} and 500 mg·L^{-1} PbAc groups compared with the control group were of statistical significance ($P<0.05$); the reduction in crossing times of central region in the 500 mg·L^{-1} PbAc group was statistically significant compared with the control group ($P<0.05$); the increases in defecation frequency in the 100 mg·L^{-1} and 500 mg·L^{-1} PbAc groups were statistically significant compared to the control group ($P<0.05$). In both positive and negative ion modes, compared with the control group, 157 differential metabolites were screened out in the 20 mg·L^{-1} PbAc group, of which 80 were up-regulated and 77 were down-regulated; 172 differential metabolites were screened out in the 100 mg·L^{-1} PbAc group, of which 57 were up-regulated and 115 were down-regulated; 119 differential metabolites were screened out in the 500 mg·L^{-1} PbAc group, of which 42 were up-regulated and 77 were down-regulated. The results of the KEGG enrichment analysis on the differential metabolites revealed alterations in metabolic pathways mainly involving primary bile acid biosynthesis, bile secretion, and cholesterol metabolism. Among the differential metabolites, norethisterone was positively correlated with the number of central region crossings (r=0.406, $P<0.05$); dihydrothymine was negatively correlated with the number of central region crossings (r=−0.346, $P<0.05$); lysophosphatidylcholine 22∶1 and lysophospholipid 14∶0 were negatively correlated with time spent in central region (r=−0.429, $P<0.05$; r=−0.374, $P<0.05$).

[Conclusion] Chronic lead exposure induces anxiety-like behavior in mice, and this altered behavior is associated with altered metabolites in serum, with differential metabolites enriched primarily in the metabolic pathways of primary bile acid biosynthesis, bile acid secretion, and cholesterol metabolism.

Keywords: lead; neurotoxicity; anxiety-like behavior; serum metabolite; metabolomics

铅是一种有毒重金属，具有难降解性，在人类生产和生活环境中广泛存在，慢性铅中毒已成为重要的公共卫生问题之一。铅可以通过多种途径进入机体，引起多个器官、系统的功能紊乱[1]，其中神经毒性是铅最主要的毒效应之一，长期低剂量接触铅可引起神经变性和精神症状，主要包括焦虑、抑郁、恐惧和认知功能下降等[2−4]。目前对于铅引起的神经毒性机制研究主要集中在铅所致的神经炎症、氧化应激、细胞凋亡、钙稳态失调等，但具体机制仍需完善[5−6]。

代谢组学是在病理生理、遗传、环境或行为的不同刺激下，对机体代谢产物变化的研究，广泛地应用于各种体液以及组织的检测。有研究报道慢性铅暴露可使小鼠粪便代谢物发生改变，代谢组学分析发现慢性铅暴露引起的小鼠粪便代谢物改变主要集中在氨基酸代谢、柠檬酸循环、能量代谢等代谢通路，还可使短链脂肪酸代谢发生紊乱，引起结肠内容物中异丁酸的改变[7]。但慢性铅暴露所致的神经行为损伤中血清代谢组学的改变以及神经行为损伤和血清代谢物之间关系的研究尚无相关文献报道。

本研究通过建立慢性铅暴露导致神经行为改变的小鼠模型，采用液相色谱-质谱联用（liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）技术对血清代谢组学的全谱进行分析，以期筛选出慢性铅暴露的差异性代谢物，从代谢组学角度为研究铅的神经毒性作用机制提供数据基础。

1 对象与方法

1.1 主要试剂与仪器

醋酸铅（PbAc；Sigma，美国），甲醇、甲酸、醋酸铵（Thermo Fisher，美国）。质谱仪（Thermo QE，美国），色谱仪（Thermo Vanquish UHPLC，美国）、色谱柱（Thermo Hypersil Gold column，美国）、低温离心机（Thermo ST16 R，美国）、TSE 视频跟踪系统（VideoMot2，德国）。

1.2 实验动物

SPF 级 4 周龄 C57BL/6J 小鼠，雌雄各 32 只，体重（15±2）g，由南方医科大学实验动物中心提供，合格证编号：SCXK（粤）2016-0041，饲养温度（22±1.5）℃，相对湿度 45%~80%。动物房保持自然照明。实验前适应性饲养一周，实验期间小鼠自由进食及饮水。100 mg·L^{-1} 铅暴露组实验过程中由于小鼠相互攻击行为死亡 5 只。实验经动物伦理委员会批准，伦理审查号：SMUL2021017。

1.3 方法

1.3.1 分组与造模 适应性饲养一周后，64 只小鼠分性别随机分为 4 组：对照组（正常饮水）；20 mg·L^{-1} 铅暴露组；100 mg·L^{-1} 铅暴露组；500 mg·L^{-1} 铅暴露组，每组雌雄各 8 只，共 16 只。PbAc 母液质量浓度为 10 g·L^{-1}，分别取 0.4、2、10 mL 加入 200 mL 高压灭菌水中，小鼠自由饮用。小鼠铅染毒共 10 周。

1.3.2 旷场实验 旷场实验装置为一个底部呈正方形的盒子（40 cm 长×40 cm 宽×30 cm 高），底部正方形中央区域（20 cm×20 cm）。将小鼠置于开放视野装置的角落，利用视频跟踪系统记录其行为 15 min。分析小鼠的总运动距离、中心区域运动时间、中心区域穿越次数，记录小鼠排便次数。

1.3.3 血清样品制备 旷场实验结束后，用水合氯醛麻醉小鼠，摘眼球，取适量血，置于 1.5 mL EP 管中。常温下静置 30 min，于 4 ℃ 下以 1 080 ×*g* 离心 15 min，取 200 μL 上层血清样品，置于−80 ℃ 保存。

1.3.4 血清样品 LC-MS/MS 分析 此部分分析由北京诺禾致源公司进行检测。取 100 μL 小鼠血清置于 EP 管中，加入 400 μL 80%（体积分数）的甲醇溶液，涡旋震荡，放置于冰上 5 min 后，于 4 ℃ 15 000 ×*g* 条件下离心 20 min。取一定量的上清液加入质谱级超纯水，将甲醇稀释至 53%（体积分数），再次于 4 ℃ 15 000 ×*g* 条件下离心 20 min，收集上清。采用 LC-MS/MS 进行分析，色谱柱采用 Hypersil Gold column（C18），色谱柱温度为 40 ℃，流速为 0.2 mL·min^{-1}。正离子模式下：流动相 A 为 0.1%（体积分数）甲酸，流动相 B 为甲醇；负离子模式下：流动相 A 为 5 mmol·L^{-1} 醋酸铵，pH=9.0，流动相 B 为甲醇；色谱梯度洗脱的流程见表 1。质谱条件扫描范围：质荷比为 100~1 500。代谢物鉴定过程：将下机数据文件（文件后缀为.raw）导入 Compound Discoverer 3.1 搜库软件中，首先筛选质荷比、保留时间等参数，再对不同的样品根据保留时间偏差 0.2 min 和质量浓度偏差 5 mg·L^{-1} 进行峰对齐。设置最小信号强度为 100 000，质量浓度偏差为 5 mg·L^{-1}，信噪比为 3，信号强度的偏差为 30%，加和离子，进行峰提取，并对峰的面积进行定量分析。整合目标离子，通过碎片离子和分子离子峰预测分子式并与 Masslist、mzCloud、mzVault 数据库进行比对，用空白样本去除背景离子的影响，并对定量结果归一化，得到数据的鉴定和定量结果。

1.3.5 统计学分析 采用主成分分析法（principal component analysis, PCA）、偏最小二乘判别分析法（partial least squares discrimination analysis, PLS-DA）分析代谢组学结果。测得代谢物通过公开数据库京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）中的信息进行代谢通路分析。采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量结果均以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验或 Dunnett-*t* 检验。采用 Pearson 相关计算行为学指标与代谢物相关性，相关系数用 *r* 表示。检验水准 α=0.05。

表 1 色谱梯度洗脱程序

Table 1 Chromatographic gradient elution procedure

时间/min Time/min	流动相A体积分数/% Mobile phase A volume fraction/%	流动相B体积分数/% Mobile phase B volume fraction/%
0	98	2
1.5	98	2
12	0	100
14	0	100
14.1	98	2
17	98	2

[注] 正离子模式下：流动相 A 为 0.1%（体积分数）甲酸，流动相 B 为甲醇；负离子模式下：流动相 A 为 5 mmol·L^{-1} 醋酸铵，pH=9.0，流动相 B 为甲醇。

[Note] In positive ion mode, mobile phase A is 0.1% (volume fraction) formic acid, and mobile phase B is methanol; In negative ion mode, mobile phase A is 5 mmol·L^{-1} ammonium acetate, pH=9.0, and mobile phase B is methanol.

2 结果

2.1 慢性铅暴露对小鼠神经行为的影响

旷场实验中，与对照组比较，100 mg·L^{-1}PbAc 和 500 mg·L^{-1}PbAc 组在中心区域运动时间减少（$P<0.05$），500 mg·L^{-1}PbAc 组中心区域穿越次数减少（$P<0.05$），100 mg·L^{-1}PbAc 和 500 mg·L^{-1}PbAc 组排便次数增加（$P<0.05$）（图 1）。

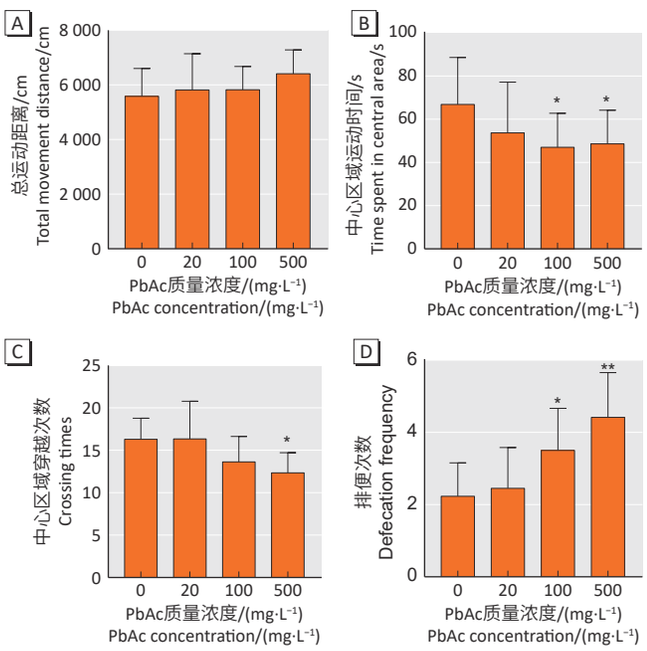
2.2 小鼠血清代谢组学分析

对不同浓度梯度 PbAc 染毒的小鼠血清代谢物进行 PCA 分析发现，无论在正离子模式还是在负离子模式下，4 组小鼠组内聚类趋势较好，各剂量组组间差异较为明显（图 2）。将对照组分别与 20 mg·L^{-1}、100 mg·L^{-1}、500 mg·L^{-1} PbAc 组小鼠血清代谢物进行 PLS-DA 分析，发现在正离子和负离子模式下，对照组与各铅暴露组间均有明显的分离趋势，各组间小鼠血清代谢谱有差异（图 3）。

2.3 差异代谢物分析

2.3.1 各组间小鼠血清差异代谢物分析 采用 PLS-DA 筛选组间差异代谢物（变量重要性投影 > 1.0，差异倍数 > 1.5 或 < 0.67 且 $P<0.05$）。对正离子和负离子模

式的差异代谢物进行汇总后，与对照组比较，20 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 157 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 80 种，下调的差异代谢物 77 种；100 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 172 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 57 种，下调的差异代谢物 115 种；500 mg·L^{-1} PbAc 组筛选出 119 种差异代谢物，其中上调的差异代谢物 42 种，下调的差异代谢物 77 种（表 2）。



[注] A：总运动距离；B：中心区域运动时间；C：中心区域穿越次数；D：排便次数。与对照组相比，*：$P<0.05$，**：$P<0.001$。

[Note] A: Total movement distance; B: Time spent in central area; C: Crossing times; D: Defecation frequency. Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.001$.

图 1 慢性醋酸铅暴露后各组小鼠旷场实验结果（$\bar{x}\pm s$，n=11~16）

Figure 1 Open field test results of mice after chronic lead acetate exposure ($\bar{x}\pm s$, n=11-16)

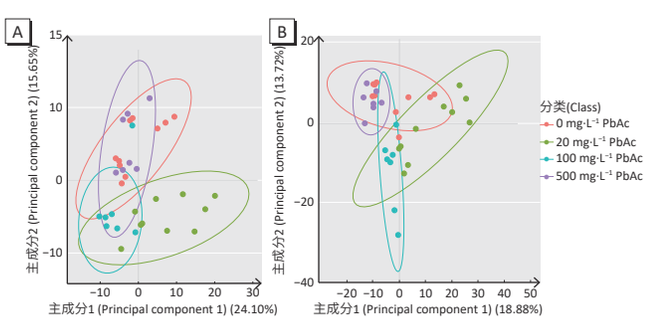
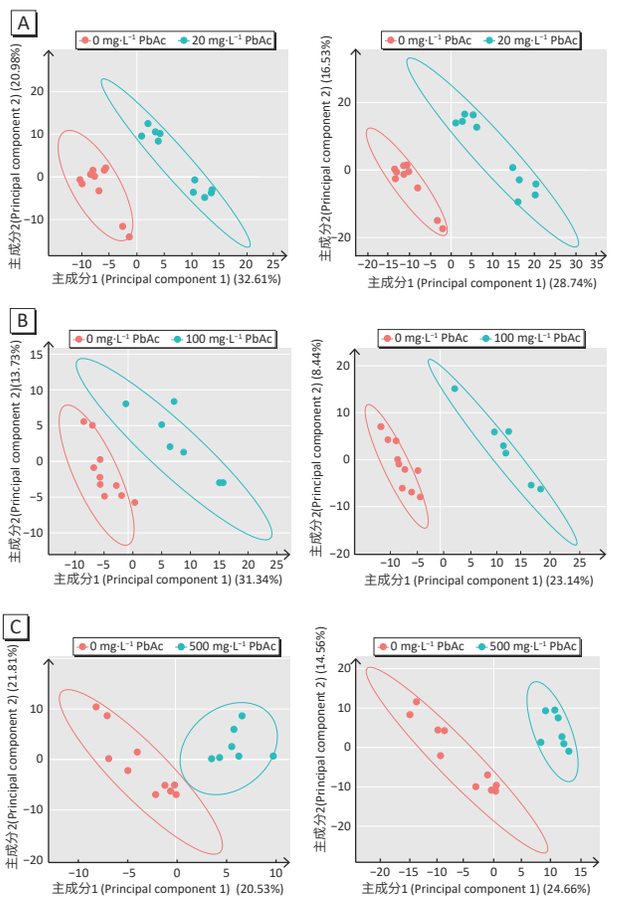


图 2 负离子（A）和正离子（B）模式下 PCA 分析图

Figure 2 Score scatter plots of PCA in both negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

2.3.2 总差异代谢物分析

将差异代谢物相对定量值进行归一化转换后，对各组之间的所有差异代谢物进行分析发现，在对照组、20 mg·L^{-1} PbAc 组、100 mg·L^{-1} PbAc 组、500 mg·L^{-1} PbAc 组中炔诺酮、溶血磷脂酰胆碱 22∶1、二氢胸腺嘧啶的含量随染毒浓度升高而降低，（R）-3-羟基肉豆蔻酸等含量随铅染毒浓度升高而升高（图 4）。



[注] A：0 mg·L^{-1} PbAc 与 20 mg·L^{-1} PbAc 组相比；B：0 mg·L^{-1}PbAc 与 100 mg·L^{-1} PbAc 组相比；C：0 mg·L^{-1} PbAc 与 500 mg·L^{-1} PbAc 组相比。

[Note] A: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 20 mg·L^{-1} PbAc group; B: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 100 mg·L^{-1} PbAc group; C: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 500 mg·L^{-1} PbAc group.

图 3 负离子（左）和正离子（右）模式下 PLS-DA 分析图

Figure 3 Score scatter plots of PLS-DA in both negative ion mode (left) and positive ion mode (right)

2.4 差异代谢物 KEGG 富集分析

与对照组比较，20 mg·L^{-1} PbAc 组的差异代谢物主要集中在花生四烯酸代谢、胆固醇代谢、5-羟色胺能突触，100 mg·L^{-1} PbAc 组的差异代谢物主要集中在初级胆汁酸的生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢，500 mg·L^{-1} PbAc 组的差异代谢物主要集中在胆固醇代谢、初级胆汁酸的合成、维生素消化吸收、酪氨酸代谢（图 5）。

2.5 差异代谢物与小鼠行为学指标相关性分析

将差异代谢物与小鼠的行为学指标进行相关性

分析，发现炔诺酮与中心区域穿越次数呈正相关（r=0.406，P<0.05），二氢胸腺嘧啶与中心区域穿越次数呈负相关（r=−0.346，P<0.05），溶血磷脂酰胆碱22:1与中心区域停留时间呈负相关（r=−0.429，P<0.05），溶血磷脂14:0与中心区域停留时间呈负相关（r=−0.374，P<0.05）（图6）。

表2 代谢物差异分析结果

Table 2 Results of differentially expressed metabolites

比较组别 Compared groups	代谢物总数 Total metabolites number	差异代谢物总数 Number of differentially expressed metabolites	上调代谢物总数 Number of up-regulated metabolites	下调代谢物总数 Number of down regulated metabolites
正离子模式(Positive mode)				
对照组和20 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 20 mg·L^{-1} PbAc group)	696	115	61	54
对照组和100 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 100 mg·L^{-1} PbAc group)	696	140	44	96
对照组和500 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 500 mg·L^{-1} PbAc group)	696	94	35	59
负离子模式(Negative mode)				
对照组和20 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 20 mg·L^{-1} PbAc group)	235	42	19	23
对照组和100 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 100 mg·L^{-1} PbAc group)	235	32	13	19
对照组和500 mg·L^{-1} PbAc组(Control group *vs.* 500 mg·L^{-1} PbAc group)	235	25	7	18

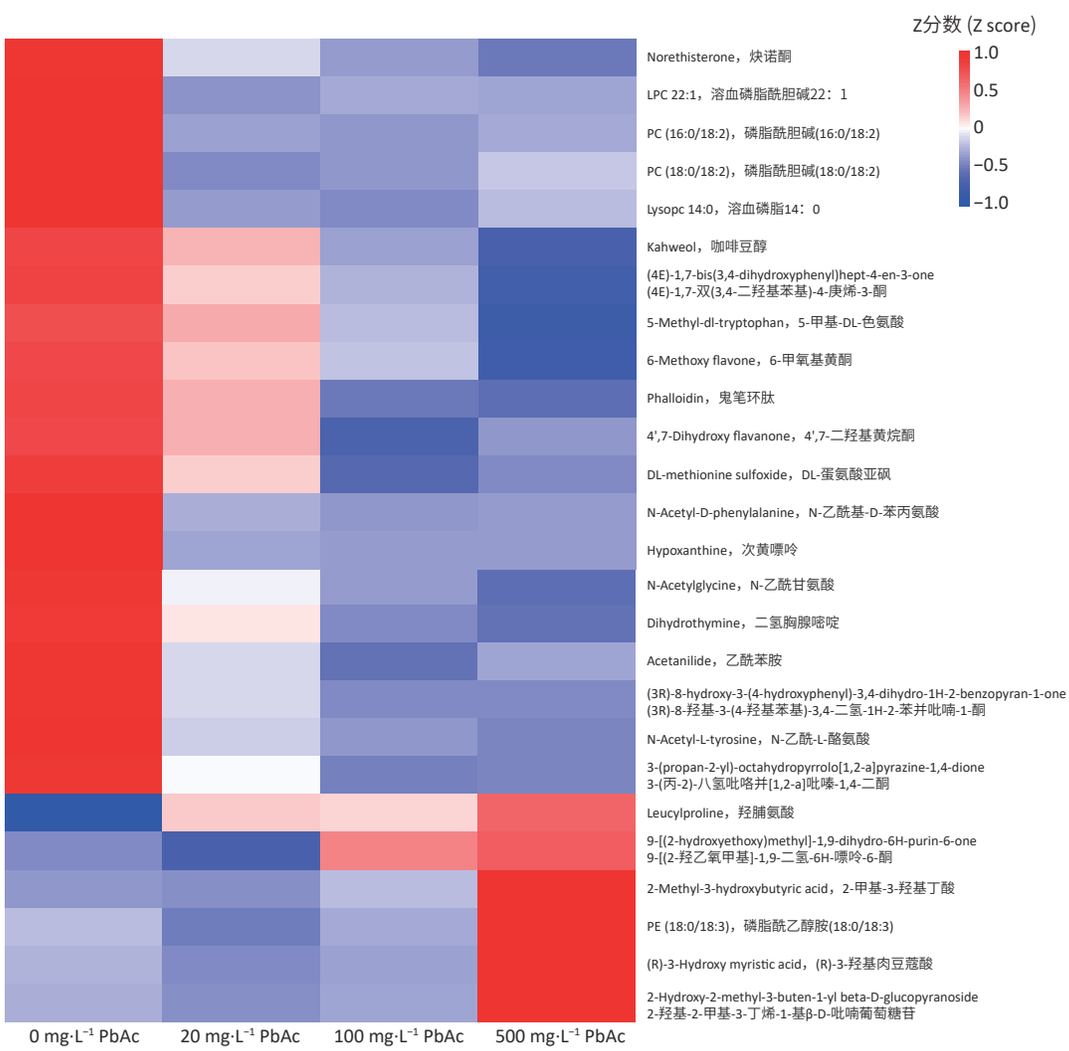
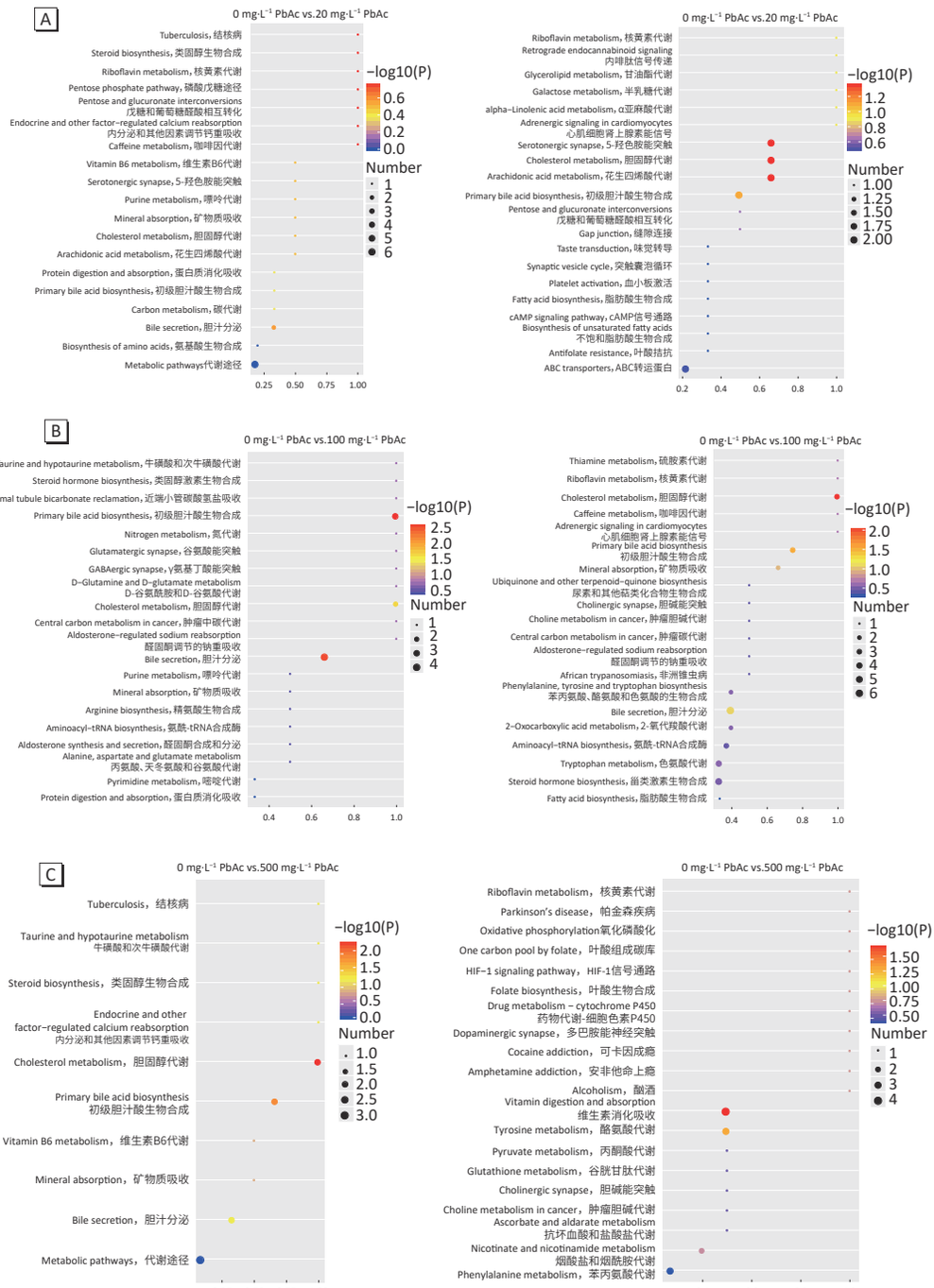


图4 血清中差异代谢物热图

Figure 4 Heat map of differentially expressed metabolites in serum

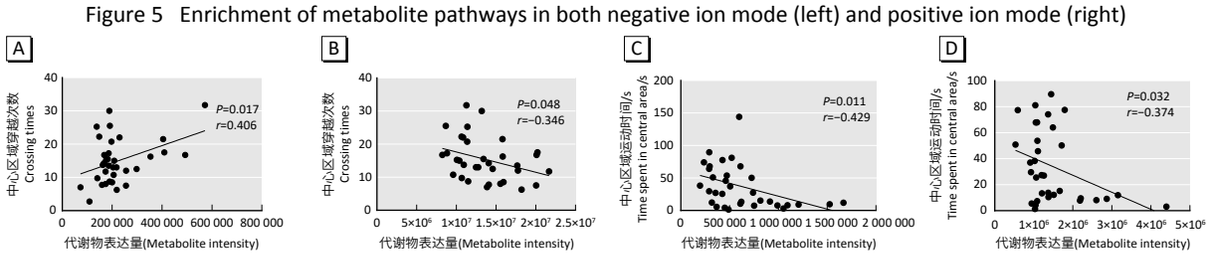


[注] A: 0 mg·L^{-1} PbAc 与 20 mg·L^{-1} PbAc 组相比；B: 0 mg·L^{-1}PbAc 与 100 mg·L^{-1} PbAc 组相比；C: 0 mg·L^{-1} PbAc 与 500 mg·L^{-1} PbAc 组相比。

[Note] A: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 20 mg·L^{-1} PbAc group; B: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 100 mg·L^{-1} PbAc group; C: 0 mg·L^{-1} PbAc group *vs.* 500 mg·L^{-1} PbAc group.

图 5 负离子（左）和正离子（右）模式下代谢通路富集分析结果

Figure 5 Enrichment of metabolite pathways in both negative ion mode (left) and positive ion mode (right)



[注] A: 炔诺酮；B: 二氢胸腺嘧啶；C: 溶血磷脂酰胆碱 22:1；D: 溶血磷脂 14:0。

[Note] A: Norethisterone; B: Dihydrothymine; C: LPC 22:1; D: Lysopc 14:0.

图 6 差异代谢物与小鼠行为学指标的相关性

Figure 6 Correlations of differentially expressed metabolites with mice behavioral indices

3 讨论

本研究通过查阅文献选择不同浓度的 PbAc 经口染毒小鼠 10 周，探讨铅暴露对神经行为学和血清代谢组学的影响。结果显示 100 mg·L^{-1} 的铅暴露可使小鼠出现焦虑样行为，而 20 mg·L^{-1} 的铅暴露小鼠未出现焦虑样行为。将小鼠血清进行代谢组学分析，筛选到的差异代谢物主要富集到初级胆汁酸的生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢等与胆汁酸相关的代谢通路上。

旷场实验利用小鼠活动具有趋避性和面对新鲜事物的好奇心，检测小鼠的焦虑状态等情绪变化和探索行为。已有研究表明铅可引起慢性神经炎症，使动物行为发生改变，并使其处于焦虑状态，这与本研究中的旷场实验结果一致[8]。本研究检测了在 15 min 内小鼠运动的总距离、中心区域停留时间、中心区域穿越次数和排便次数共 4 个指标，结果显示在 15 min 内小鼠运动的总距离在各组间没有明显改变，说明铅暴露对小鼠的活力没有造成影响。探索行为能帮助动物熟悉周围环境，获取环境信息，在铅暴露后，小鼠在中心区域运动时间和穿越中心区域的次数均减少，表明小鼠的探索性行为减少[9−11]。在啮齿动物中，排便次数的增加与恐惧反应的增加有关[12]，本研究结果显示，铅暴露后，小鼠排便的频率增多，提示铅暴露能引起小鼠的恐惧和应激反应。

慢性铅暴露可引起机体代谢物发生改变。本研究中，各剂量 PbAc 组小鼠血清的代谢物均有变化。将差异代谢物进行 KEGG 分析发现，在 20 mg·L^{-1} PbAc 组中富集到的代谢通路有花生四烯酸代谢和 5-羟色胺能 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 突触代谢通路。花生四烯酸代谢与炎症相关，花生四烯酸通过一系列前列腺素合成酶的作用生成前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2），PGE2 是介导炎症反应的主要效应分子，促炎细胞因子刺激细胞膜表面的 Toll 样受体并激活下游核因子-κB，通过一系列级联反应使环氧合酶-2 表达并产生 PGE2，引起炎症反应[13]。5-HT 突触代谢通路主要涉及 5-HT 的改变，5-HT 是一种单胺类神经递质，分布于胃肠、血液和中枢神经系统，可影响机体多种生物学及行为学功能，在中枢神经系统中 5-HT 被认为是诱发焦虑抑郁的重要物质。本研究中 100 mg·L^{-1} PbAc 组富集到的代谢通路主要有初级胆汁酸的生物合成、胆汁分泌。胆汁酸的功能主要是参与脂类消化吸收和胆固醇代谢，目前胆汁酸被视为信号分子或激素，在机体内分泌调节、能量代谢、免疫功能调节等方面发挥重要作用[14]。本研究富集到的初级胆汁酸的合成、胆汁分泌和胆固醇代谢通路，与胆汁酸的代谢密切相关，已有研究也表明铅可引起胆汁酸代谢通路发生改变[15]。胆汁酸可能通过作用于脑部胆汁酸受体，如蛋白偶联受体 5、法尼醇 X 受体、维生素 D 受体等发挥作用[16]。本研究中 500 mg·L^{-1} PbAc 组富集到的代谢通路主要有胆汁分泌、胆固醇代谢、维生素消化吸收、酪氨酸代谢。胆固醇代谢紊乱是一些神经退行性疾病发生的重要因素，一项前瞻性队列研究表明较高的胆固醇水平可能增加阿尔茨海默病的患病风险[17]。本次实验 100 mg·L^{-1} 与 500 mg·L^{-1} PbAc 组筛选到的差异代谢物主要富集在与胆汁酸代谢相关的通路，20 mg·L^{-1} PbAc 组小鼠未出现神经行为改变，并且富集的代谢通路与中高剂量 PbAc组有不同之处，其代谢通路的差异可能是神经行为异常的原因。

相关性分析结果显示，小鼠神经行为学改变可能与代谢产物炔诺酮、二氢胸腺嘧啶、溶血磷脂酰胆碱 22∶1、溶血磷脂 14∶0 的变化相关。溶血磷脂酰胆碱是哺乳动物体内重要的脂质分子，是构成细胞膜及氧化脂蛋白的主要组成部分。研究表明，溶血磷脂酰胆碱可引起小胶质细胞等免疫细胞的活化，促使巨噬细胞炎症因子分泌增加，诱导炎症反应[18]。据报道，慢性铅暴露可引起小鼠海马区小胶质细胞激活，海马区出现炎症反应[5]，这可能与慢性铅中毒引起的溶血磷脂酰胆碱升高有关。溶血磷脂 14∶0 是一种促炎介质，可引起炎症因子白介素-1β 的升高，并可诱导不同细胞产生活性氧，通过核因子-κB 参与多种信号的激活，引起环氧合酶-2 表达升高[19]。目前未见炔诺酮和二氢胸腺嘧啶与神经毒性相关性研究的报道，有待进一步研究。

综上所述，铅引起的神经毒性可能与初级胆汁酸的生物合成、胆汁分泌、胆固醇代谢等有关。本实验仅对代谢物的改变与行为学改变进行相关性分析，未涉及铅引起的代谢物改变是如何引起小鼠神经行为的改变，其中具体机制还有待进一步探究。

参考文献

[1] ZHAI Q, QU D, FENG S, et al. Oral supplementation of lead-intolerant intestinal microbes protects against lead (Pb) toxicity in mice[J]. Front Microbiol, 2020, 10: 3161.

[2] SANDERS T, LIU Y, BUCHNER V, et al. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review[J]. Rev Environ Health, 2009, 24(1): 15-45.

[3] SOBIN C, MONTOYA M G F, PARISI N, et al. Microglial disruption in young mice with early chronic lead exposure[J]. Toxicol Lett, 2013, 220(1): 44-52.

[4] SANTA MARIA M P, HILL B D, KLINE J. Lead (Pb) neurotoxicology and cognition[J]. Appl Neuropsychol Child, 2019, 8(3): 272-293.

[5] SU P, WANG D, CAO Z, et al. The role of NLRP3 in lead-induced neuroinflammation and possible underlying mechanism[J]. Environ Pollut, 2021, 287: 117520.

[6] YANG W, TIAN ZK, YANG HX, et al. Fisetin improves lead-induced neuroinflammation, apoptosis and synaptic dysfunction in mice associated with the AMPK/SIRT1 and autophagy pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 134: 110824.

[7] XIA J, JIN C, PAN Z, et al. Chronic exposure to low concentrations of lead induces metabolic disorder and dysbiosis of the gut microbiota in mice[J]. Sci Total Environ, 2018, 631-632: 439-448.

[8] 周戬平, 王帆, 杨玉凤, 等. 孕期铅暴露对子代大鼠情感行为及学习记忆变化的实验研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2012, 20(2): 135-138.
ZHOU JP, WANG F, YANG YF, et al. Experimental study of the effects of lead exposure of pregnant rat on emotion, behavior, learning and memory in filial rats[J]. Chin J Child Health Care, 2012, 20(2): 135-138.

[9] KASTEN-JOLLY J, PABELLO N, BOLIVAR VJ, et al. Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female BALB/cAnNTac mice[J]. Neurotoxicology, 2012, 33(5): 1005-1020.

[10] RAMIREZ ORTEGA D, OVALLE RODRÍGUEZ P, PINEDA B, et al. Kynurenine pathway as a new target of cognitive impairment induced by lead toxicity during the lactation[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3184.

[11] MOREIRA EG, VASSILIEFF I, VASSILIEFF VS. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term[J]. Neurotoxicol Teratol, 2001, 23(5): 489-495.

[12] FLORES-MONTOYA MG, SOBIN C. Early chronic lead exposure reduces exploratory activity in young C57BL/6J mice[J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(7): 759-765.

[13] 宋一萌, 李明真, 马潞林. 花生四烯酸代谢产物与肿瘤发生和发展的研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2017, 32(3): 236-240.
SONG YM, LI MZ, MA LL. Research advances in the association between arachidonic acid metabolites and tumorigenesis[J]. J Clin Urol, 2017, 32(3): 236-240.

[14] 李森, 贾子衡, 魏雪睿, 等. 胆汁酸的代谢稳态调控作用综述[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(8): 1126-1130.
LI S, JIA ZH, WEI XR, et al. Role of bile acid on maintaining metabolic homeostasis[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ (Med Sci), 2020, 40(8): 1126-1130.

[15] ZHAI Q, LIU Y, WANG C, et al. Lactobacillus plantarum CCFM8661 modulates bile acid enterohepatic circulation and increases lead excretion in mice[J]. Food Funct, 2019, 10(3): 1455-1464.

[16] BHARGAVA P, SMITH MD, MISCHE L, et al. Bile acid metabolism is altered in multiple sclerosis and supplementation ameliorates neuroinflammation[J]. J Clin Invest, 2020, 130(7): 3467-3482.

[17] SCHILLING S, TZOURIO C, SOUMARÉ A, et al. Differential associations of plasma lipids with incident dementia and dementia subtypes in the 3 C Study: a longitudinal, population-based prospective cohort study[J]. PLoS Med, 2017, 14(3): e1002265.

[18] JEONG H, KIM YH, LEE Y, et al. TRPM2 contributes to LPC-induced intracellular Ca^{2+} influx and microglial activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2): 301-306.

[19] TSENG HC, LIN CC, WANG CY, et al. Lysophosphatidylcholine induces cyclooxygenase-2-dependent IL-6 expression in human cardiac fibroblasts[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(24): 4599-4617.

(**英文编辑**：汪源; **责任编辑**：汪源)

(上接第 132 页)

[12] ROCA M, SÁNCHEZ A, PÉREZ R, et al. Biomonitoring of 20 elements in urine of children. Levels and predictors of exposure[J]. Chemosphere, 2016, 144: 1698-1705.

[13] PIRARD C, KOPPEN G, DE CREMER K, et al. Hair mercury and urinary cadmium levels in Belgian children and their mothers within the framework of the COPHES/DEMOCOPHES projects[J]. Sci Total Environ, 2014, 472: 730-740.

[14] ASTOLFI ML, VITALI M, MARCONI E, et al. Urinary mercury levels and predictors of exposure among a group of Italian children[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(24): 9225.

[15] 鲍宇, 杨晓波. 不同生物样本中14种金属暴露生物标志物的比较研究[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(10): 1049-1056.
BAO Y, YANG XB. Comparative study of 14 metal exposure biomarkers in biological samples[J]. J Environ Occup Med, 2021, 38(10): 1049-1056.

[16] LI X, CHI W, TIAN H, et al. Probabilistic ecological risk assessment of heavy metals in western Laizhou Bay, Shandong Province, China[J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0213011.

[17] FÁBELOVÁ L, VANDENTORREN S, VUILLERMOZ C, et al. Hair concentration of trace elements and growth in homeless children aged < 6 years: results from the ENFAMS study[J]. Environ Int, 2018, 114: 318-325.

[18] 姜帅, 田雨来, 刘强, 等. 江苏某县3岁儿童尿中重金属水平与生长发育的关系[J]. 环境与职业医学, 2014, 31(1): 18-24.
JIANG S, TIAN YL, LIU Q, et al. Association of lead, mercury, and cadmium in urine and development of three-year-old children in a county of Jiangsu province[J]. J Environ Occup Med, 2014, 31(1): 18-24.

[19] KIM K E, SHIN Y H, EOM S Y, et al. Impacts of heavy metal exposure on adiposity and pubertal development in Koran children and adolescents[R]. Washington: ENDOCRINE SOCIETY, 2015.

[20] KIPPLER M, ENGSTRÖM K, MLAKAR SJ, et al. Sex-specific effects of early life cadmium exposure on DNA methylation and implications for birth weight[J]. Epigenetics, 2013, 8(5): 494-503.

[21] GONZÁLEZ-COSSÍO T, PETERSON KE, SANÍN LH, et al. Decrease in birth weight in relation to maternal bone-lead burden[J]. Pediatrics, 1997, 100(5): 856-862.

[22] BEIER EE, MAHER JR, SHEU TJ, et al. Heavy metal lead exposure, osteoporotic-like phenotype in an animal model, and depression of Wnt signaling[J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(1): 97-104.

[23] GREEN AJ, HOYO C, MATTINGLY CJ, et al. Cadmium exposure increases the risk of juvenile obesity: a human and zebrafish comparative study[J]. Int J Obes (Lond), 2018, 42(7): 1285-1295.

(**英文编辑**：汪源; **责任编辑**：丁瑾瑜)