

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.35.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 35-0018-05

铅暴露时间对大脑皮质 ATG5、Beclin1、LC3B 表达的影响

卢北玲¹, 史剑飞², 周军³

(1. 陕西省西安市中医医院 检验科, 陕西 西安 710001; 2. 陕西省西安市儿童医院 检验科, 陕西 西安 710003; 3. 中南大学湘雅医院 医学科学研究中心, 湖南 长沙 410008)

摘要: 目的 通过复制成年动物铅暴露模型, 研究铅暴露时间长短对大脑皮质自噬蛋白 ATG5、Beclin1、LC3B 表达的变化。**方法** 选取 18 只豚鼠随机分为 4 组: 对照组 (3 只), 以及铅暴露 15、60 和 90 d 组 (每组 5 只)。用 0.2% 醋酸铅饮用水复制动物铅暴露模型, 对照组给予等量的生理盐水喂养; 免疫组织化学法检测 ATG5、Beclin1 和 LC3B 的表达。**结果** 与对照组相比, 不同时间铅暴露组自噬蛋白 ATG5、Beclin1 和 LC3B 的阳性表达升高 ($P < 0.05$)。铅暴露 90 d 组的 ATG5 表达水平与各暴露组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。铅暴露 15 d 组与 60 d 组的 ATG5 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各暴露组 Beclin1 和 LC3B 蛋白水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 环境铅饮用水可通过自噬蛋白 ATG5、Beclin1 及 LC3B 引起大脑皮质区的自噬反应, 推测铅暴露激活的早期自噬反应可能对大脑皮质发挥神经毒性作用, 对成年豚鼠大脑造成不可逆转的损害。

关键词: 铅中毒; 蛋白; 大脑皮质; 自噬

中图分类号: R115

文献标识码: A

Effect of lead exposure time on expressions of autophagy proteins ATG5, Beclin1 and LC3B in cerebral cortex

Bei-ling Lu¹, Jian-fei Shi², Jun Zhou³

(1. Clinical Laboratory, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710001, China; 2. Clinical Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China; 3. Medical Science Research Center, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To study the effect of lead exposure time on expressions of autophagy proteins including ATG5, Beclin1 and LC3B in the cerebral cortex by establishing the lead exposure model in adult guinea pigs. **Methods** Eighteen guinea pigs were randomly divided into 4 groups, with 3 in the control group (without lead exposure) and 5 in each of the 3 lead exposure groups with exposure to lead for 15, 60 and 90 days. The model was established using 0.2% lead acetate drinking water, and the control group was given the same amount of normal saline. The expression levels of ATG5, Beclin1 and LC3B proteins were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the positive expressions of ATG5, Beclin1 and LC3B were significantly increased in the 15-day, 60-day and 90-day lead exposure groups ($P < 0.05$). The expression level of ATG5 in the 90-day lead exposure group was significantly higher than those of other lead exposure groups ($P < 0.05$). No significant difference was observed in the expression level of ATG5 between the 15-day and 60-day lead exposure groups ($P > 0.05$).

And there was no significant difference in the expression level of Beclin1 or LC3B among the lead exposure groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Lead drinking water can cause autophagy in the cerebral cortex through the autophagy proteins ATG5, Beclin1 and LC3B. It is speculated that the early autophagic response induced by lead exposure may exert neurotoxic effect on cerebral cortex and cause irreversible damage in adult guinea pigs.

Keywords: lead poisoning; cerebral cortex; autophagy-related proteins

铅是广泛存在于自然界的一种重金属, 对中枢神经系统的损害是不可逆的^[1]。铅暴露造成幼脑学习能力下降, 但却鲜有文献解释成年人在铅暴露环境下的变化, 以及不同时间的铅暴露对大脑功能的影响是否一致。文献报道主要集中在铅对脑海马区的损伤, 很少对脑皮质功能的改变进行研究^[1-3]。本实验将豚鼠在含铅环境暴露不同时间后, 对皮质表达的自噬蛋白进行分析, 为早期预防铅暴露危害提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年豚鼠, 雌雄不限, 体重 400 ~ 500 g, SPF 清洁级, 由中南大学实验动物学部提供。全部实验动物在适应性饲养 5 ~ 7 d 后用于实验, 分笼饲养, 12 h 昼/夜循环照明, 自由饮食和饮水, 室温 (20 ± 2) °C。

1.2 主要仪器与试剂

0.2% 醋酸铅溶液 (上海碧云天生物公司), ATG5 (NB100-53818)、Beclin1 (NBP1-00085)、LC3B (NB100-2220) 购自美国 Novus 公司, 多功能酶标仪 (M200pro, 奥地利 Tecan 公司), 石蜡包埋机 (EG1150)、倒置显微镜 (DM2000) 购自德国 Leica 公司。

1.3 实验动物分组与处理

18 只成年豚鼠随机分为 4 组: 对照组 (3 只), 以及铅暴露 15、60 和 90 d 组 (每组 5 只)。对照组给予等量的生理盐水, 铅暴露组用 0.2% 醋酸铅饮用水喂养豚鼠。喂养不同时间后对动物进行麻醉, 断头取脑, 立即放入 4% 多聚甲醛溶液中进行固定、脱水、石蜡包埋、切片。

1.4 免疫组织化学法

石蜡切片在烤箱烤干后, 进行脱蜡及水化, 用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 浸泡切片 2、3 次, 5 ~ 10 min/次, 用 3% GS 或 10% HS 封闭 40 min, PBS 洗 3 次, 加入抗 ATG5 (1 : 500)、

Beclin1 (1 : 500)、LC3B (1 : 500) 4°C 孵育过夜, 次日用 PBS 洗 3 次, 10 min/次, 加入相对应的二抗 (1 : 400) 室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 用 DAB 进行显色。在显微镜下观察, 直到出现满意的颜色, 脱水、封片、晾干后用普通倒置显微镜对大脑皮质区 (根据海马区情况进行皮质区的视野选取, 在拍照过程中选取海马周边的皮质区进行拍照, 每张片子保持一样的脑皮质位置) 进行拍片统计 (不连续的 3 ~ 5 个视野)。

1.5 统计学方法

数据分析采用 Graphpad prism 6.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

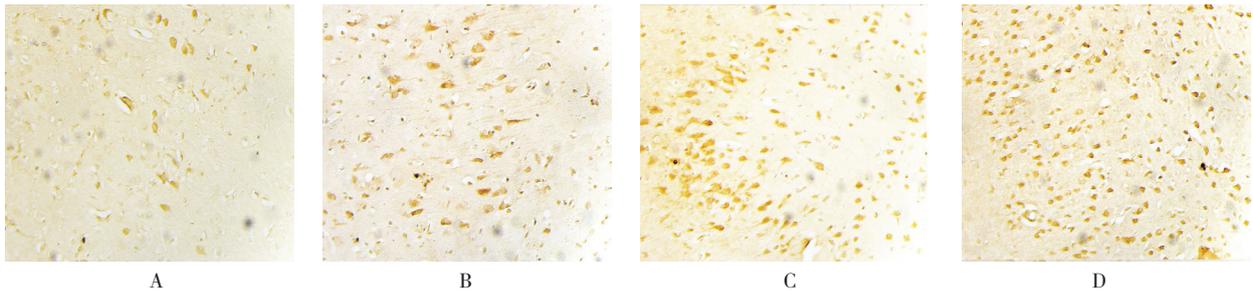
2 结果

2.1 不同时间铅暴露后豚鼠脑皮质区 ATG5 的阳性表达比较

ATG5 阳性表达在细胞质或细胞膜。对照组, 以及铅暴露 15、60 和 90 d 组的 ATG5 阳性细胞数分别为 (87.08 ± 53.27)、(86.38 ± 48.18)、(93.77 ± 43.45) 和 (152.08 ± 44.32) 个/HP, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.643$; $P = 0.005$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 铅暴露 90 d 组高于对照组 ($P < 0.05$); 对照组与其余各组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 不同时间铅暴露后, ATG5 有不同程度的升高, 但铅暴露 90 d 组升高最明显, 推测 ATG5 在铅暴露后早期可能起保护大脑组织的作用, 而随着铅暴露时间的延长, ATG5 蛋白表达更加明显, 引起脑神经细胞的损伤。见图 1、2。

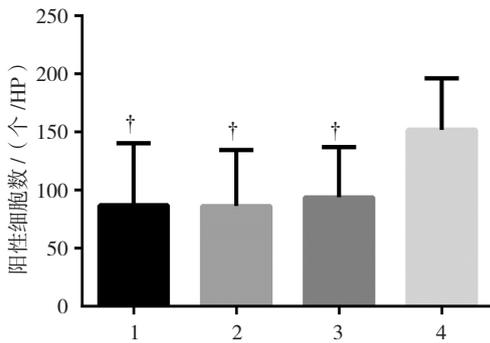
2.2 不同时间铅暴露对豚鼠大脑皮质 Beclin 1 蛋白表达的影响

Beclin 1 蛋白定位在神经元胞质或细胞膜。对照组, 以及铅暴露 15、60 和 90 d 组的 Beclin 1 阳性细胞数分别为 (32.00 ± 23.89)、(108.31 ± 35.25)、



A: 对照组; B: 铅暴露 15 d 组; C: 铅暴露 60 d 组; D: 铅暴露 90 d 组

图 1 各组豚鼠脑皮质区 ATG5 的表达 (免疫组织化学法 × 200)



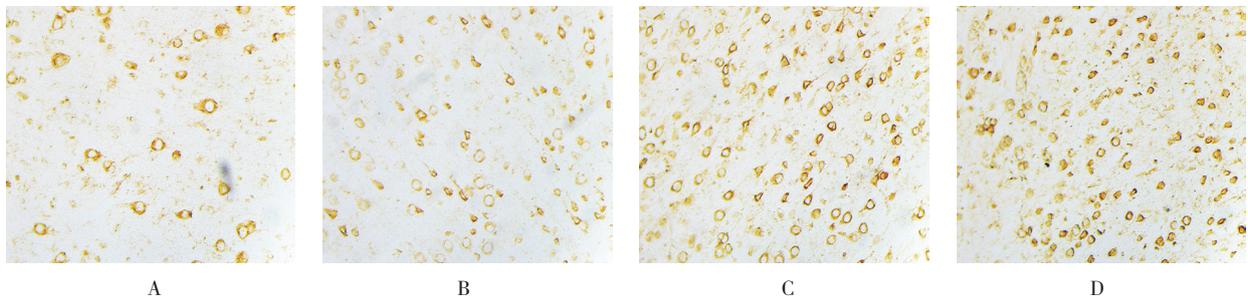
1: 对照组; 2: 铅暴露 15 d 组; 3: 铅暴露 60 d 组; 4: 铅暴露 90 d 组。†与铅暴露 90 d 组比较, $P < 0.05$

图 2 各组豚鼠 ATG5 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

(123.85 ± 33.82) 和 (126.62 ± 26.77) 个 /HP, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 25.910$; $P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 对照组与其他组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 铅暴露 15、60 和 90 d 组组间两两比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但是随着铅暴露时间延长, Beclin1 阳性细胞数也升高, 可见随着铅暴露时间延长, 自噬蛋白 Beclin1 的表达升高。见图 3、4。

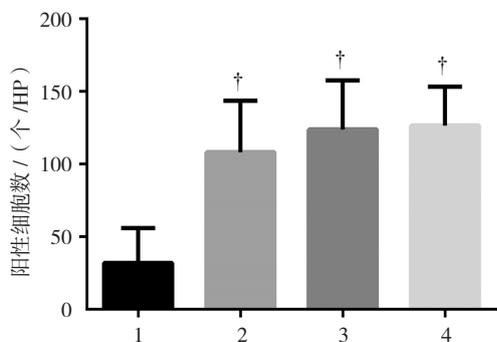
2.3 慢性铅暴露下豚鼠大脑皮质 LC3B 的表达变化

脑皮质区自噬蛋白 LC3B 主要表达在细胞膜, 阳



A: 对照组; B: 铅暴露 15 d 组; C: 铅暴露 60 d 组; D: 铅暴露 90 d 组

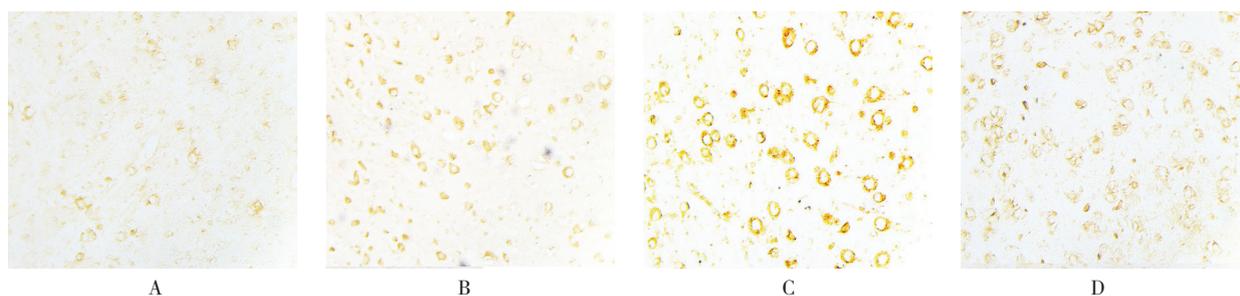
图 3 各组豚鼠脑皮质区 Beclin1 的表达 (免疫组织化学法 × 200)



1: 对照组; 2: 铅暴露 15 d 组; 3: 铅暴露 60 d 组; 4: 铅暴露 90 d 组。†与对照组比较, $P < 0.05$

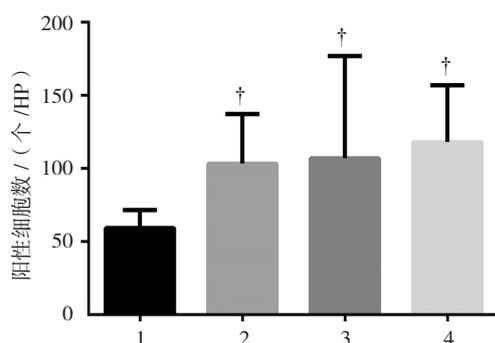
图 4 各组豚鼠 Beclin1 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

性细胞呈现棕黄色。对照组, 以及铅暴露 15、60 和 90 d 组的 LC3B 阳性细胞数分别为 (59.38 ± 12.18)、(103.46 ± 33.96)、(107.38 ± 70.27) 和 (118.08 ± 38.91) 个 /HP, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 7.575$; $P = 0.002$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 对照组与其他组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 铅暴露 15、60 和 90 d 组组间两两比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果提示, 铅饮用水可引起大脑皮质区 LC3B 升高。LC3B 阳性表达与 Beclin1 的变化趋势一致。见图 5、6。



A: 对照组; B: 铅暴露 15 d 组; C: 铅暴露 60 d 组; D: 铅暴露 90 d 组

图 5 各组豚鼠脑皮质区 LC3B 的表达 (免疫组织化学法 $\times 200$)



1: 对照组; 2: 铅暴露 15 d 组; 3: 铅暴露 60 d 组; 4: 铅暴露 90 d 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 6 各组豚鼠 LC3B 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

人类铅暴露通常来自于水、空气及土壤污染, 长期处在高铅环境中将会损害大脑发育, 包括细胞增殖等, 但是其具体作用机制并不清楚, 仍然是亟待解决的健康问题^[2]。铅具有很强的亲组织性和神经毒性, 且铅浓度升高是导致神经不可修复, 以及儿童生理和行为障碍的关键原因。自噬水平升高可能是一种代偿性的保护效应, 但在自噬反应超过某一阈值, 表现为过度激活的情况下, 会进一步损伤细胞器并促发自噬性细胞死亡^[3]。自噬是真核细胞中广泛存在的降解系统, 在自噬过程中, 大部分胞质蛋白和损害的细胞器通过溶酶体聚集和降解, 但是对应激和损伤的过度自噬反应会导致自噬性细胞死亡, 说明自噬在组织细胞清除中起双刃剑的作用^[4]。有研究指出, 自噬是细胞死亡的诱发因素^[5]。暴露于铅环境的动物与人脑组织中均可观察到老年斑和神经纤维缠结^[6]。重金属铅仍是构成环境有毒物质的危险因素, 但是没有研究指出铅是阿尔茨海默病或 Tau 蛋白形成的诱因。对年龄 >65 岁老人进行横向研究发现, 血液中高水平铅组认知能力明显下降^[7]。铅很容易通过胎盘屏障, 尤其是鼠受孕期处于铅暴露环境中, 会对子鼠的行为学发

育造成不可逆的损害; 在铅暴露停止后, 这些行为学改变会继续持续很长时间, 还可引起胆碱能系统的改变^[8]。妊娠期或哺乳期接触铅会引起胎儿神经元氧化应激, 导致大脑认知相关蛋白水平改变, 且胎儿大脑发育过程中对毒性铅有易感性, 导致新生的神经元增殖或神经元突触连接发生中断^[9]。Beclin1 可能在自噬和凋亡 2 种程序性细胞死亡中发挥调节作用^[10]。

本实验中, 豚鼠在不同时间铅暴露后 ATG5、Beclin1 和 LC3B 的表达水平较对照组升高, 进一步说明大脑组织中自噬相关蛋白对神经元起调节作用。铁可降低动物血液和脑组织的铅浓度, 在一定程度上对大脑具有保护性效应, 可能是因为铅铁离子倾向于引起氧化性效应而不是神经中和效应^[11]。在发育时期铅暴露可降低突触的可塑性, 造成认知功能和行为学紊乱, 这是早期生命铅暴露导致的最常见的效应, 且铅暴露效应对负责空间记忆和理解的大脑海马区更易产生影响^[12]。铅可促进原代大鼠近端肾小管细胞 (proximal tubular, PT) 中自噬溶酶体的聚集, 且自噬蛋白的增多和溶酶体膜透化对肾小管细胞的凋亡抑制作用促进了铅的肾小管毒性^[13]。自噬和细胞凋亡是细胞发展的 2 种结果, 铅抑制 PT 细胞自噬的降解, 然而自噬降解抑制剂加重铅诱导的细胞凋亡, 自噬与凋亡的相互联系有助于进一步了解铅诱导的肾毒性的具体机制^[14]。

在铅暴露环境中, 女性更容易患阿尔茨海默症, 所以需要进一步探索铅暴露对胚胎期小鼠引发的危险^[15]。神经干细胞在大脑发育过程中扮演重要角色, 铅可以阻断其功能, 可能是铅诱导红系衍生的核转录因子 2 诱导依赖的转录性反应, 导致分泌型磷蛋白 1 的上调^[16]。自噬参与自噬溶酶体的形成, 而且自噬溶酶体已经被广泛用于 Caspase 非依赖的细胞死亡通路, 与大脑缺血再灌注损伤有关, 而且干扰 RNA 介导的 Beclin1 表达下降减弱了大鼠的脑缺血损伤, 这可能与

降低凋亡,促进神经再生有关,因此 Beclin1 的降低有助于改善中风患者的病情^[17]。有研究证明,铅可能会损害人和动物的免疫系统,铅可诱导细胞氧化性应激,影响线粒体的动态平衡和自噬反应的发生,导致脾脏的免疫紊乱^[18]。还有研究证实,在代谢应激的情况下,ATG7 通过调节 p53 的活性来调节细胞周期和细胞活性^[19]。但也有研究指出,大脑海马和皮质区的自噬标志物表达有明显区别,在氧糖剥夺模型诱导后的早期,皮质区出现自噬反应但海马区无,且自噬抑制剂的使用阻断其诱发的谷氨酸释放效应^[20]。本实验选取不同时间铅暴露后豚鼠的大脑皮质区,进一步探讨环境铅对成年鼠引发的自噬反应,对铅接触的早期预防提供实验依据。

参 考 文 献:

- [1] 何翦太,朱轩仪,巫放明. 铅中毒和驱铅药物的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(14): 53-57.
- [2] 熊伟,赵英,万炜,等. 铅暴露对大鼠大脑皮质和海马 NOS 的影响 [J]. 南华大学学报(医学版), 2007, 35(3): 329-331.
- [3] MOSTAFA G A, BJORKKLUND G, URBINA M A, et al. The positive association between elevated blood lead levels and brain-specific autoantibodies in autistic children from low lead-polluted areas[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(5): 1047-1054.
- [4] ZHU J H, HORBINSKI C, GUO F, et al. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(1): 75-86.
- [5] YEO B K, HONG C J, CHUNG K M, et al. Valosin-containing protein is a key mediator between autophagic cell death and apoptosis in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal[J]. *Mol Brain*, 2016, 9: 31.
- [6] SHIMADA H, OGATA T, TAKANO K, et al. Evaluation of the time-dependent changes and the vulnerability of carotid plaques using contrast-enhanced carotid ultrasonography[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018. 27(2): 321-325.
- [7] DASH M, EID A, SUBAIEA G, et al. Developmental exposure to lead (Pb) alters the expression of the human tau gene and its products in a transgenic animal model[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 55: 154-159.
- [8] BASHA C D, REDDY R G. Long-term changes in brain cholinergic system and behavior in rats following gestational exposure to lead: protective effect of calcium supplement[J]. *Interdiscip Toxicol*, 2015. 8(4): 159-168.
- [9] HOSSAIN S, BHOWMICK S, JAHAN S, et al. Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in the offspring rats[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 56: 150-158.
- [10] 黄继云,叶田. 慢性铅暴露大鼠海马脑区自噬相关蛋白表达的研究 [J]. 浙江大学学报, 2012, 41(4): 402-409.
- [11] FERREIRA M C, ZUCKI F, DUARTE J L, et al. Influence of iron on modulation of the antioxidant system in rat brains exposed to lead[J]. *Environ Toxicol*. 2017. 32(3): 813-822.
- [12] EBRAHIMZADEH-BIDESKAN A R, HAMI J, ALIPOUR F, et al. Protective effects of ascorbic acid and garlic extract against lead-induced apoptosis in developing rat hippocampus[J]. *Metab Brain Dis*. 2016. 31(5): 1123-1132.
- [13] SONG X B, LIU G, LIU F, et al. Autophagy blockade and lysosomal membrane permeabilization contribute to lead-induced nephrotoxicity in primary rat proximal tubular cells[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): DOI: 10.1038/cddis.2017.262.
- [14] CHU B X, FAN R F, LIN S Q, et al. Interplay between autophagy and apoptosis in lead (II)-induced cytotoxicity of primary rat proximal tubular cells[J]. *J Inorg Biochem*, 2018, 182: 184-193.
- [15] LEE J, PETERSON S M, FREEMAN J L. Sex-specific characterization and evaluation of the Alzheimer's disease genetic risk factor sor11 in zebrafish during aging and in the adult brain following a 100 ppb embryonic lead exposure[J]. *J Appl Toxicol*, 2017, 37(4): 400-407.
- [16] WAGNER P J, PARK H R, WANG Z, et al. In vitro effects of lead on gene expression in neural stem cells and associations between up-regulated genes and cognitive scores in children[J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(4): 721-729.
- [17] ZHENG Y Q, LIU J X, LI X Z, et al. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7): 919-927.
- [18] HAN Y, LI C, SU M, et al. Antagonistic effects of selenium on lead-induced autophagy by influencing mitochondrial dynamics in the spleen of chickens[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33725-33735.
- [19] LEE I H, KAWAI Y, FERGUSSON M M, et al. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress[J]. *Science*, 2012, 336(6078): 225-228.
- [20] PEREZ-RODRIGUEZ D, ANUNCIBAY-SOTO B, LLORENTE I L, et al. Hippocampus and cerebral cortex present a different autophagic response after oxygen and glucose deprivation in an ex vivo rat brain slice model[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41(4): e68-e79.

(童颖丹 编辑)