

Influence of Lead on the Apoptosis and the Expression of *fos*, *jun*, *p53* and Nitric Oxide Synthase in Rat Brain

铅对大鼠脑细胞凋亡的诱发作用及对 *fos*、*jun*、*p53* 基因和一氧化氮合酶表达的影响

AN Lan-min¹, NIU Yu-jie², XU Bing², LIU Na¹

(1. Health and Anti-epidemic Station of Shijiazhuang, Shijiazhuang, 050011, Hebei, china; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011 Hebei, China)

安兰敏¹/牛玉杰²/徐兵²/刘纳¹

(1. 石家庄市卫生防疫站, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050011)

【摘要】背景与目的: 通过对醋酸铅诱导大鼠脑细胞凋亡及对 *fos*、*jun*、*P53* 基因和一氧化氮合酶表达的影响, 进一步揭示铅的神经毒作用机制。材料与方法: 成年 SD 大鼠经腹腔注射醋酸铅染毒, 分别用原位末端标记法观测细胞凋亡, 用 SP 法测定脑组织中 *fos*、*jun*、*P53* 及 nNOS 和 iNOS 的蛋白表达情况。结果: 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量染铅组大鼠海马、皮层组织凋亡细胞数量明显增加, 并和染铅剂量有良好的剂量效应关系; 大鼠脑组织海马、皮层 *fos*、*jun*、*P53*、iNOS 表达阳性细胞数显著增加, 表达强度有升高趋势; 各剂量染铅组海马组织中 nNOS 表达明显升高, 而皮层组织 nNOS 表达无明显变化; 相关分析表明, 铅诱导的神经细胞凋亡与 *fos*、*jun*、*P53* 及 iNOS 的表达呈正相关。结论: 在铅诱导神经细胞凋亡的过程中, 高表达的 NOS 使得 NO 生成过多进而引起 DNA 损伤, 激活 *P53*, 同时使 *fos*、*jun* 表达增加也可激活 *P53*, 启动凋亡过程, 诱导细胞发生凋亡。

【关键词】铅; 神经毒性; 凋亡; *fos* 基因; *jun* 基因; 一氧化氮合酶

中图分类号: R135.11

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)05-0359-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of *fos*, *jun*, *P53* and NOS and to provide some scientific basis for further delineation of the neurotoxic mechanisms of lead. MATERIAL AND METHODS: Mature and healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups. Lead acetate was injected intraperitoneally. The determination of apoptosis in hippocampus and cerebral cortex was made by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick and labeling(TUNEL). The expression of *fos*, *jun*, *P53* genes and nNOS, iNOS in hippocampus and cerebral cortex were measured by using immunohistochemical method. RESULTS: ① TUNEL showed that lead acetate induced apoptosis of cells from hippocampus, cerebral cortex in every treatment group ($P < 0.05$), and there was a significant dose-response relationship. ② The expression of *fos*, *jun*, *P53* and iNOS increased in neural cells from hippocampus, cerebral cortex in every lead acetate treatment group compared with the control. ③ The expression of nNOS significantly increased in hippocampus in every treatment group compared with the control. However the expression of nNOS in cerebral cortex showed no significant difference between the treatment groups and the control group. ④ Correlation analysis demonstrated that apoptosis correlated positively with the expression of *fos*, *jun*, *P53* and iNOS. CONCLUSION: The overexpression of *P53*, which was caused by damage of DNA elicited by the excessive amount of NO from the overexpression of NOS, induced apoptosis of neural cells. Lead acetate also induced the prolonged expression of *fos* and *jun* which may initiate the expression of *P53* followed by apoptosis of neural cells.

【KEY WORDS】 lead; neurotoxicity; apoptosis; *fos* gene; *jun* gene; nitric oxide synthase

收稿日期: 2005-12-01; 修订日期: 2006-02-28

基金项目: 河北省科技攻关项目(No.022761111)

作者简介: 安兰敏(1970-), 女, 河北省人, 主管医师, 硕士, 研究方向: 食品卫生卫生监督。Tel: 86-311-86982764, E-mail: lanmin-an@sina.com

铅是环境中一种常见的污染物,但铅的神经毒作用机制至今尚未完全阐明。本研究用不同剂量醋酸铅处理成年大鼠,观察其脑细胞凋亡的发生情况以及癌基因 *fos*、*jun*、抑癌基因 *p53* 和一氧化氮合酶(NOS)表达的变化,为揭示铅的神经毒作用机制,预防和治疗铅中毒提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器 兔抗鼠 Fos 多克隆抗体、兔抗鼠 Jun 多克隆抗体、兔抗鼠 P53 多克隆抗体、兔抗鼠 nNOS 多克隆抗体、兔抗鼠 iNOS 多克隆抗体、过氧化物酶标记的链酶卵蛋白素染色试剂盒即 SP-Kit(抗兔)(含生物素化 IgG 及辣根酶标记链酶卵蛋白素 S-A/HRP)、DAB-Kit、山羊血清蛋白、脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)和生物素地高辛标记的脱氧核苷酸(dNTP) Biotin-11-dUTP 混合液、亲和素辣根过氧化物酶(Avidin-HRP),以上试剂均购自北京中山生物制品有限公司;醋酸铅、多聚甲醛、乌拉坦为 Sigma 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器 石蜡切片机:LEICA RM2125 水浴箱:DK-8A(上海医用恒温设备厂) 显微镜为 UFX-II(日本 Olympus 公司),图像分析系统采用北京航空航天大学医学自动图像分析管理系统。

1.3 实验动物 健康成年 SD 大鼠,体重 200 ± 20 g,医动字 04035 号,由河北医科大学实验动物中心提供。

1.4 方法

1.4.1 动物的分组及处理 取健康成年雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为 3 个实验组(醋酸铅染毒剂量分别为 25、50、100 mg/kg)和对照组共 4 组,每组 6 只,普通饲料和蒸馏水喂养,试验前喂养观察一周,试验组经腹腔注射染毒,每日一次,连续染毒 5 d,于第 6 d 取材,对照组则给予相应体积的蒸馏水,步骤同实验组。

1.4.2 样本取材 按文献[1]方法各组大鼠腹腔注射给予乌拉坦(1.5 g/kg)深麻醉。打开胸腔,经左心室插管入主动脉,用 4%多聚甲醛(用 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.4, 4 °C) 500 ml 灌注 1~1.5 h。灌注完毕后断头,冰盘上沿冠状面方向从视神经交叉下将脑组织切下,置 4 °C 的 4%多聚甲醛中固定 24 h。常规酒精脱水包埋制备石蜡切片。

1.4.3 检测方法 用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL 法)检测大鼠脑组织细胞凋亡的发生情况^[2]。用免疫组化染色(SP 法)检测癌基因 *fos* 的表达产物 Fos 蛋白, *jun* 的表达产物 Jun 蛋

白、抑癌基因 *P53* 的表达产物 P53 蛋白及 NOS 的表达产物(包括 nNOS 和 iNOS)。

1.4.4 结果判定 原位末端标记染色切片、免疫组化染色切片脑组织不同部位参照包新民等著《大鼠脑立体定位图谱》辨认^[3]。以 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)代替 TdT 和 Biotin-11-dUTP 混合液、Fos、Jun、P53、NOS 一抗作为空白对照。组织细胞显示棕色或棕黄色颗粒者为阳性细胞,不显色为阴性反应。

1.4.5 显微照相及图像分析 用日本 Olympus 公司产 UFX-II 显微照相系统进行,底片为柯达彩色胶卷。用北京航空航天大学医学自动图像分析管理系统对切片进行定量分析。

1.4.6 统计学方法 所有数据均用 SAS 6.12 进行方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡的诱发作用 光镜下观察,染铅组大鼠脑组织中凋亡细胞标记物质呈棕黄色颗粒状,皮层阳性表达物多靠近皮层的外缘,分布密集,着色深;海马凋亡阳性表达物分布分散,着色浅;正常对照组相应部位仅见少数细胞表达阳性,着色浅;空白对照未见表达阳性。各剂量染毒组大鼠大脑海马、皮层细胞凋亡面密度明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),并有良好的剂量-效应关系(海马、皮层分别为: $r = 0.924, P < 0.05$; $r = 0.964, P < 0.05$),而平均灰度与对照组相比有降低趋势,但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明醋酸铅处理后大鼠脑组织凋亡细胞数量明显增加(表 1)。

表 1 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of lead acetate on the apoptosis of rat brain neural cells ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density ($\times 10^{-2}$)	Average grey	Area density ($\times 10^{-2}$)	Average grey
Control	0.08 ± 0.02	191.27 ± 8.00	0.03 ± 0.01	152.04 ± 8.81
25	1.76 ± 0.06*	180.48 ± 4.72	4.55 ± 0.87*	183.91 ± 16.15
50	2.12 ± 1.17*	194.10 ± 7.10	8.17 ± 1.64*	153.83 ± 32.49
100	2.95 ± 0.68*	189.96 ± 3.86	11.17 ± 5.66*	140.40 ± 30.40

Compared with the control, * $P < 0.05$.

2.2 醋酸铅对大鼠脑组织相关基因表达的影响

2.2.1 醋酸铅对大鼠脑组织 *fos* 表达的影响 染铅组大鼠脑组织中 Fos 蛋白免疫组化反应物质呈棕色颗粒状,位于神经细胞核内,胞浆亦有部分表达。对照组相应部位仅见少数细胞 Fos 蛋白阳性表达,着色浅,空白对照均未见阳性表达。各染毒剂量组海马组织中 Fos 表达明显增强,与对照组相比面密度明显增高,而平均灰度则显著降低($P < 0.05$),并有良好的剂量效应

关系(海马面密度、平均灰度分别为: 0.971, $P < 0.05$; $r = -0.777$, $P < 0.05$); 皮层组织中, 中、高剂量组面密度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而平均灰度与对照组相比差异无统计学意义。说明醋酸铅处理后大鼠脑组织中 Fos 表达的细胞数量增加, 表达产物有增多趋势(表 2)。

表 2 醋酸铅对大鼠脑组织中 fos 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of lead acetate on the expression of fos in rat brain ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey
Control	0.23 ± 0.05	161.00 ± 5.80	0.20 ± 0.05	160.85 ± 21.28
25	0.69 ± 0.12*	171.98 ± 9.02	0.31 ± 0.14	164.98 ± 12.93
50	0.87 ± 0.26*	149.14 ± 9.44*	0.83 ± 0.12*	159.20 ± 8.96
100	2.50 ± 0.95*	143.59 ± 5.09*	2.30 ± 0.69*	151.16 ± 8.93

Compared with the control, * $P < 0.05$.

2.2.2 醋酸铅对大鼠脑组织 jun 表达的影响 醋酸铅处理后, 染铅组大鼠脑组织中 Jun 蛋白免疫组化反应物质表达特点同 Fos。各染毒剂量组海马、皮层组织中 Jun 蛋白表达明显增强, 和对照组相比面密度显著增加 ($P < 0.05$), 并有良好的剂量 - 反应关系(海马、皮层分别为 $r = 0.960$, $P < 0.05$; $r = 0.975$, $P < 0.05$)。海马组织中、100 mg/kg 剂量组平均灰度显著低于对照组 ($P < 0.05$), 皮层 100 mg/kg 剂量组平均灰度明显低于对照组 ($P < 0.05$)。说明醋酸铅处理后大鼠脑组织 Jun 表达阳性细胞数量显著增多(表 3)。

表 3 醋酸铅对大鼠脑组织中 jun 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of lead acetate on the expression of jun in rat brain ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey
Control	0.06 ± 0.01	202.50 ± 5.23	0.08 ± 0.01	197.00 ± 2.69
25	2.29 ± 0.26*	185.23 ± 7.74	0.80 ± 0.08*	191.25 ± 8.39
50	2.08 ± 0.22*	178.40 ± 15.26*	3.77 ± 0.91*	181.70 ± 10.04
100	5.39 ± 1.57*	163.60 ± 9.51*	5.71 ± 1.51*	172.22 ± 23.98*

Compared with the control, * $P < 0.05$.

2.2.3 醋酸铅对大鼠脑组织 P53 表达的影响 光镜下观察, 染铅组皮层、海马 P53 蛋白免疫组化反应物质与 FOS 蛋白相似。醋酸铅处理后, 各染毒剂量组海马、皮层组织中 P53 表达明显增强, 面密度随染毒剂量增加而上升, 和对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并有良好的剂量反应关系(分别为 $r = 0.771$, $P < 0.05$; $r = 0.936$, $P < 0.05$); 平均灰度除皮层高剂量组显著低于对照组外 ($P < 0.05$), 其他各组差异无统计学意义。说明醋酸铅处理后 P53 表达阳性细胞数量显著增多(表 4)。

表 4 醋酸铅对大鼠脑组织中 p53 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of lead acetate on the expression of p53 in rat brain ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey
Control	0.38 ± 0.27	192.06 ± 5.60	0.27 ± 0.01	173.85 ± 1.20
25	0.91 ± 0.55*	183.74 ± 10.40	0.32 ± 0.21	174.93 ± 18.06
50	0.98 ± 0.26*	201.85 ± 2.76	0.50 ± 0.12*	167.74 ± 6.61
100	1.01 ± 0.30*	180.56 ± 8.24	1.67 ± 0.74*	152.86 ± 5.55*

Compared with the control, * $P < 0.05$.

2.3 醋酸铅对大鼠脑组织中 NOS 表达的影响

光镜下观察, 染铅组大鼠皮层、海马 nNOS、iNOS 免疫组化反应物质呈棕黄色颗粒状, 位于神经元细胞核内, 部分胶质细胞亦有表达, nNOS 对照组有少量表达, iNOS 对照组无表达。醋酸铅处理后, 各染毒组海马组织 nNOS 表达明显上升, 面密度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 平均灰度与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 皮层组织中 nNOS 表达无明显变化, 与对照组相比, 面密度和平均灰度均没有显著改变 ($P > 0.05$)。各剂量染铅组 iNOS 海马、皮层组织中面密度表达均明显上升, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并有良好的剂量 - 反应关系(分别为: $r = 0.896$, $P < 0.05$; $r = 0.923$, $P < 0.05$); 海马组织平均灰度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而皮层组织各剂量组平均灰度和对照组比较差异无统计学意义。说明铅在海马组织可诱导 nNOS 的表达, 并激活 iNOS 在海马及皮层组织的表达, 结果见表 5 和表 6。

表 5 醋酸铅对大鼠脑组织中 nNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of lead acetate on the expression of nNOS in rat brain ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey
Control	0.24 ± 0.10	143.30 ± 26.78	0.28 ± 0.08	111.67 ± 28.84
25	0.70 ± 0.18*	142.05 ± 13.75	0.43 ± 0.19	109.05 ± 23.52
50	0.85 ± 0.17*	143.36 ± 8.05	0.33 ± 0.05	109.08 ± 15.69
100	0.91 ± 0.19*	148.57 ± 6.99	0.37 ± 0.11	102.10 ± 9.07

Compared with the control, * $P < 0.05$.

表 6 醋酸铅对大鼠脑组织中 iNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of lead acetate on the expression of iNOS in rat brain ($\bar{x} \pm s$)

Group (mg · kg ⁻¹)	Hippocampus		Cerebral cortex	
	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey	Area density (× 10 ⁻²)	Average grey
Control	0.12 ± 0.02	148.80 ± 10.75	0.02 ± 0.01	126.30 ± 5.52
25	1.32 ± 0.14*	113.57 ± 5.32*	0.30 ± 0.07*	130.44 ± 14.11
50	1.50 ± 0.16*	110.52 ± 6.62*	1.07 ± 0.20*	137.96 ± 9.23
100	1.98 ± 0.35*	110.32 ± 12.57*	1.23 ± 0.17*	131.29 ± 25.18

Compared with the control, * $P < 0.05$.



2.4 醋酸铅诱导细胞凋亡与 *fos*、*jun*、*P53* 及 *NOS* 表达的相关关系 醋酸铅染毒后,大鼠海马组织细胞凋亡面密度与 *Fos*、*Jun*、*P53*、*nNOS* 及 *iNOS* 均呈明显的正相关,相关系数 r 分别为 0.850、0.927、0.954、0.976、0.998 (以上相关系数经检验均 $P < 0.05$),大脑皮层细胞凋亡面密度除了与 *nNOS* 的表达未见相关关系外,与 *Fos*、*Jun*、*P53* 及 *iNOS* 均呈明显的正相关,相关系数 r 分别为 0.871、0.960、0.809、0.968 (以上相关系数经检验均差异有统计学意义, $P < 0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡是一个主动的、固有的程序化细胞死亡方式,许多生理或病理过程都有细胞凋亡的参与和调节^[4,5],TUNEL 是研究细胞凋亡常用的一种方法,灵敏度远比一般方法高。本研究发现铅可诱发大鼠脑细胞凋亡,由于细胞凋亡对于维持细胞总体数量具有重要的作用,故可认为细胞凋亡在铅对神经系统的损伤中起着十分重要的作用。细胞凋亡的发生,受到许多因素的调控,如癌基因 *bcl-2*、*bax*、*fos*、*jun*、抑癌基因 *P53* 及 *NO* 等^[6,7]。正常情况下,神经细胞中 *fos*、*jun*、*P53* 均有低水平表达。本试验观察到铅可增加大鼠脑组织中 *fos*、*jun* 基因的表达,*fos*、*jun* 的过量表达一方面可以诱发脑组织细胞凋亡,另一方面,可能作为核内转录调控因子调节其它凋亡相关基因的表达,在本研究中表现为 *p53* 的表达升高。野生型 *P53* 是一种肿瘤抑制基因,其生物学功能是在 G_1 期监视细胞基因组 DNA 的完整性^[8],阻断细胞于周期检查点,另外还可直接诱导凋亡的功能。一氧化氮(*NO*)是由一氧化氮合酶(*NOS*)以 L-精氨酸为底物合成的结构简单的气体分子,参与多种细胞功能的调节,可通过 *NOS* 的活性来反映体内 *NO* 的生成情况。*NOS* 3 种亚型中 *nNOS* 在细胞处于生理状态即有表达,而 *iNOS* 生理状态下不表达,在受细胞因子等刺激后呈诱导性表达,*iNOS* 一旦被激活则很难调节,并产生大量的 *NO*,直至底物耗竭,*iNOS* 合成增多是引起体内 *NO* 过量产生的基础。本研究提示铅可以增加海马组织中 *nNOS* 含量,并促进 *iNOS* 蛋白在海马、皮层神经细胞内的合成。细胞凋亡和有关基因及 *NOS* 的表达是一个互相影响的非常复杂的过程。野生型 *P53* 与细胞凋亡呈正相关,*NO* 可影响细胞凋亡,在其诱导细胞凋亡时有 *P53* 基因表达,提示 *p53* 在 *NO* 诱发凋亡中有作用。另外 *NO* 还能增加 *fos* 等基因的 mRNA 水平,*NO* 促进 IEG 表达

的能力依赖于某些细胞内因子,且仅是神经元的一个亚群成为 *NO* 转录效应的靶位。本研究证实铅诱导的神经细胞凋亡与 *fos*、*jun*、*P53*、*NOS* 呈现正相关,说明以上因素在铅的神经毒性中起着重要的作用。

综上,铅对神经系统的损伤过程由此可推断如下:铅通过诱导 *NOS* 大量表达,产生大量 *NO*,除 *NO* 自身造成的细胞损伤外,还包括大量的 *NO* 引起大鼠脑细胞核内第三信使 *fos*、*jun* 和 *P53* 等表达的增强,造成大鼠皮层、海马的细胞凋亡增加。皮层、海马均与学习和记忆有关,大量的细胞凋亡必定造成对中枢神经系统的损害及学习记忆的不良影响。当然,铅的神经毒作用机制相当复杂,本研究仅是其分子作用机制的一个环节,完全阐明铅神经毒作用机制尚需进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] 杜卓民. 实用组织技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 8 - 18.
- [2] 温进坤, 韩梅. 医学分子生物学原理与实验技术 [M]. 第 1 版, 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 242 - 244.
- [3] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 40 - 46.
- [4] Kaufman PL, Abelt BT, Cynader M. Introductory comments on neuroprotection[J]. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43(1): 89 - 90.
- [5] Osborne NN, Ugarte M, Chao M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma[J]. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43(1): 102 - 128.
- [6] Brune B, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 351(2): 261 - 272.
- [7] 田雪梅, 刘进康, 李进. 一氧化氮对血管平滑肌细胞中 BCL2、BAX、P53、Fas 蛋白表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(1): 38 - 41.
- [8] Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes[J]. *J Immunol*, 1995, 155(1): 2 858 - 2 865
- [9] Draganow M, Young D, Hughes P, et al. Is c-juninvolved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxicischaemic brain injury[J]. *Mol Brain Res*, 1993, 8(4): 347 - 352
- [10] Draganow M, Beilharz E, Sirimanne E, et al. Immediate-early gene/protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxicischaemic injury to the young rat brain [J]. *Mol Brain Res*, 1994, 25(1-2): 19 - 33.
- [11] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 101 - 217.