

文章编号: 1004-616X(2003)04-0209-04

铅对大鼠脑细胞凋亡的诱发作用及对 *P53* 基因表达影响的研究<sup>①</sup>安兰敏<sup>1</sup>, 杨 军<sup>1</sup>, 徐 兵<sup>2</sup>

(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】**目的: 为进一步揭示铅的神经毒作用机制, 对醋酸铅诱导大鼠脑细胞凋亡及对 *P53* 基因表达的影响进行了研究。方法: 取成年 SD 大鼠, 每组 6 只, 染毒剂量分别为 25、50、100 mg/kg, 连续染毒 5 d, 经升主动脉灌注 4% 多聚甲醛内固定后分别取其海马、皮层部位脑组织, 制备石蜡切片, 用原位末端标记法观测细胞凋亡, 免疫组化方法分别测定海马、皮层组织中 *P53* 的蛋白含量。结果: 各剂量组大鼠海马、皮层组织凋亡细胞数量明显增加, 显著高于对照组, 并有良好的剂量反应关系; 大鼠脑组织海马、皮层 *P53* 表达阳性细胞数显著增加, 表达强度有升高趋势; 铅诱导的神经细胞凋亡与 *P53* 的表达呈正相关。结论: 醋酸铅可以诱发大鼠皮层、海马细胞的凋亡, 且与剂量呈正相关; 醋酸铅可以促进大鼠海马、皮层细胞中 *P53* 基因的表达, 并有良好的剂量反应关系, 提示 *P53* 可能作为调控因子参与铅对中枢神经系统损害的毒性过程; 高表达的 *P53* 启动凋亡过程, 诱导细胞凋亡。

**【关键词】** 铅; 大鼠; 神经毒性; 凋亡; *P53* 基因

中图分类号: R135.1\*1 文献标识码: A

## STUDIES ON THE APOPTOSIS AND THE EXPRESSION OF p53 BY LEAD IN RAT BRAIN

AN Lan-min<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, XU Bing<sup>2</sup>

(1. Health and anti-epidemic station of Shijiazhuang, Shijiazhuang, 050011 China; 2. Hebei Medical University, shijiazhuang 050011, China)

**【Abstract】 Purpose:** To provide some scientific basis for the revealment of neurotoxic mechanism of lead, The present study was undertake to the effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of *P53*. **Methods:** Mature and health Sprague-Dawley rats were divided into four groups randomly, six rats in every group. Lead acetate was given at the dosage of 25, 50, 100 mg/kg through ip for 5 days, respectively. 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 *P53* genes in hippocampus and cerebral cortex was observed by using immuno-histochemical method. **Results:** The results of 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. The expression of *P53* increased in neural cells from hippocampus, cerebral cortex in every lead acetate treatment group compared with the control, and there was a significant dose-response relationship. Correlation analysis demonstrated that the apoptosis were positively correlated with the expression of *P53*. **Conclusion:** Lead may elicit apoptosis of rat neural cells from hippocampus, cerebral cortex, and the apoptosis was positive correlative with the lead dosage. Lead acetate may promote the expression of *P53* genes, and there was a good dose-response relationship. The results above suggested that *P53* as a regular factor of apoptosis, may participate in the neurotoxic damaging to the central nervous system by lead. The

<sup>①</sup> 收稿日期: 2003-02-24; 修订日期: 2003-05-15

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, 主要从事环境卫生监督监测工作。

Tel: 0311-6089785, E-mail: lanmin-an@sohu.com

overexpression of *P53* induced the apoptosis of neural cells. Lead acetate may initiate the expression of *P53* followed by the apoptosis of neural cells.

【Key words】 lead; rat; neurotoxicity; apoptosis; *P53* gene

铅是环境中一种常见的污染物,可造成人体多器官系统的损害,中枢神经系统是其毒性作用的靶器官之一,但铅的神经毒作用机制至今尚未完全阐明。据报道铅能抑制体外培养神经元的分化<sup>[1]</sup>,其神经毒性与细胞凋亡有关<sup>[2]</sup>。细胞凋亡是一个主动的、固有的程序化的细胞死亡方式,许多生理或病理过程都有细胞凋亡的参与和调节<sup>[3,4]</sup>。细胞凋亡的发生,受到许多因素的调控,如癌基因 *bcl-2*、*bax*、*P53*<sup>[5,6]</sup>。为研究铅对神经细胞凋亡的诱导及相关基因的作用,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及抑癌基因 *P53* 的表达,以便进一步揭示铅的神经毒作用机制,为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

兔抗鼠 *P53* 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:UFX-II(日本 Olympus 公司)。北京航空航天大学医学图像分析管理系统。

### 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 动物的分组及处理

取健康成年雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为 4 组,每组 6 只,试验前观察一周,根据预试验确定醋酸铅染毒剂量分别为 25、50、100 mg/kg。将醋酸铅溶于蒸馏水中按 0.4 ml/100g 腹腔注射,对照组给予蒸馏水,每日 1 次,共染毒 5 d,于第 6 d 取材。

### 1.5 样本取材<sup>[7]</sup>

1.5.1 灌注固定 各组大鼠腹腔注射乌拉坦

(1.5 g/kg),使深麻醉。打开胸腔,经左心室插管入主动脉,用 37℃生理盐水 150 ml 快速冲洗,继用 4%多聚甲醛(用 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.4, 4℃) 500 ml 灌注,先快后慢,时间约为 1~1.5 h。

1.5.2 取材切片 灌注完毕后断头,冰盘上迅速剥离出完整脑组织,剔除硬脑膜及软脑膜。沿冠状面方向从视神经交叉下将脑组织切下,置 4℃的 4%多聚甲醛中继续后固定 24 h。

### 1.6 脱水包埋及切片

将标本放进 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液内 12 h,中间换两次缓冲液。之后入 70%、80%、90%、95%、100% I、100% II 酒精梯度脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,用石蜡切片机进行连续石蜡切片,厚 6 μm。连续取两张邻片进行展片共展两套切片。分别进行细胞凋亡、*P53* 免疫组化染色。

### 1.7 细胞凋亡的检测<sup>[8]</sup>

用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-dexonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL 法)检测大鼠脑组织细胞凋亡的发生情况。

### 1.8 *P53* 抑癌基因表达产物的检测

用 SP 法免疫组化染色测定检测癌基因 *P53* 的表达产物 *P53* 蛋白。

### 1.9 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参考文献[9]辨认。以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 代替 TdT 和 Biotin-11-dUTP 混合液、*P53* 一抗作为空白对照。组织细胞显示棕色或棕色颗粒者为阳性细胞,不显色为阴性反应。

## 2 结果

### 2.1 醋酸铅对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,差异有显著性( $P < 0.05$ ),并有良好的剂量-反应

关系(海马、皮层  $r$  值分别为:  $0.924, P < 0.05; 0.964, P < 0.05$ )。而平均灰度与对照组相比有降低趋势,但未见显著性差异( $P > 0.05$ ),结果见表1。

表 1. 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡的诱发作用

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

Group	hippocampus		cerebral cortex	
	Area density (%)	Average grey level	Area density (%)	Average grey level
Control	$0.08 \pm 0.02$	$191.27 \pm 8.00$	$0.03 \pm 0.01$	$152.04 \pm 8.81$
Low dosage	$1.76 \pm 0.06^*$	$180.48 \pm 4.72$	$4.55 \pm 0.87^*$	$183.91 \pm 16.15$
Middle dosage	$2.12 \pm 1.17^*$	$194.10 \pm 7.10$	$8.17 \pm 1.64^*$	$153.83 \pm 32.49$
High dosage	$2.95 \pm 0.68^*$	$189.96 \pm 3.86$	$11.17 \pm 5.66^*$	$140.40 \pm 30.40$

\* compared with control,  $P < 0.05$

有部分表达。对照组相应部位仅见少数细胞 P53 蛋白阳性表达,着色浅,空白对照均未见阳性表达。各剂量组海马、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,与对照组相比差异有显著性 ( $P$

## 2.2 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呈棕色颗粒,位于神经细胞核内,胞浆亦

$< 0.05$ ), 并有良好的剂量反应关系 ( $r$  值分别为  $0.771, P < 0.05; 0.936, P < 0.05$ ); 平均灰度除皮层高剂量组显著低于对照组外 ( $P < 0.05$ ), 其他各组未见显著性差异,结果见表2。

表 2. 醋酸铅对大鼠脑细胞 P53 基因表达的影响

Table 2. Effect of lead acetate on the expression of P53 in rat brain ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	hippocampus		cerebral cortex	
	Cortex area density (%)	Average grey level	Area density (%)	Average grey level
Control	$0.38 \pm 0.27$	$192.06 \pm 5.60$	$0.27 \pm 0.01$	$173.85 \pm 1.20$
Low dosage	$0.91 \pm 0.55^*$	$183.74 \pm 10.40$	$0.32 \pm 0.21$	$174.93 \pm 18.06$
Mid - dosage	$0.98 \pm 0.26^*$	$201.85 \pm 2.76$	$0.50 \pm 0.12^*$	$167.74 \pm 6.61$
High dosage	$1.01 \pm 0.30^*$	$180.56 \pm 8.24$	$1.67 \pm 0.74^*$	$152.86 \pm 5.55^*$

\* compared with control,  $P < 0.05$

## 2.3 细胞凋亡与 P53 相关关系

相关分析表明,醋酸铅染毒后,大鼠、海马、皮层组织细胞凋亡面密度与 P53(相关系数  $r$  分别为  $0.954, P < 0.05; 0.809, P < 0.25$ )。

## 3 讨论

细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序而主动死亡的过程。各种外来因素都有可能诱导细胞凋亡的发生,如毒物、电离辐射、高温、生长因子缺乏等。铅是一种十分常见的环境污染物,长期接触可造成神经系统的损害,但其神经毒作用机制至今尚未完全明了。本研究观察了醋酸铅处理后大鼠海马和皮层细胞凋亡的发生情况以及 P53 抑癌基因表达变化,探讨了 P53 基因在铅诱导细胞凋亡中的作用。

### 3.1 对大鼠脑细胞凋亡的诱发作用

凋亡细胞具有特征性的形态学和生物化学改变,可采用多种方法检测细胞凋亡,如:DNA 电泳、流式细胞技术、原位末端标记和形态学染色等<sup>[10]</sup>。TUNEL 是常用的一种方法,具有准确、灵敏等特点。本研究发现,醋酸铅可使大鼠海马、大脑皮层组织出现典型的

细胞凋亡,且凋亡细胞数量显著升高,在皮层表现更为明显,并与染铅剂量有很好的相关性,说明铅确实可诱发大鼠脑细胞凋亡,这与相关报道是一致的<sup>[2]</sup>。由于细胞凋亡对于维持细胞总体数量具有重要的作用,所以脑细胞过多凋亡必然会对中枢神经系统造成损伤,与铅染毒引起大鼠学习、记忆改变的观点相一致<sup>[11]</sup>。因此,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。

### 3.2 对 P53 表达的影响及在细胞凋亡中的作用

野生型 P53 是一种肿瘤抑制基因,在正常细胞中有低水平表达。P53 诱导细胞凋亡与其 DNA 结合功能及基因调控功能有关。P53 的生物学功能是在 G<sub>1</sub> 期监视细胞基因组 DNA 的完整性。如果 DNA 受到损伤, P53 蛋白就使细胞停留在 G<sub>1</sub> 期,修复后再进入 M 期;如损伤不能修复,则诱导凋亡,避免异常细胞进入细胞周期,从而发挥其维护基因组完整的作用<sup>[12]</sup>。目前, P53 诱导凋亡的下游途径仍不完全清楚,但已发现,在 *bcl-2* 中有 P53 结合元件, P53 与之结合,可以使 *bcl-2* 表达下降,这可能是 P53 诱导凋亡的机制之一<sup>[13]</sup>。P53 基因除有阻断细胞于周期检查点的作

下转第 222 页

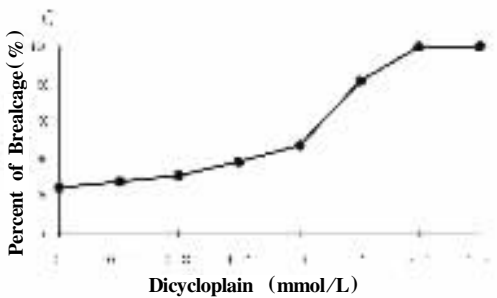
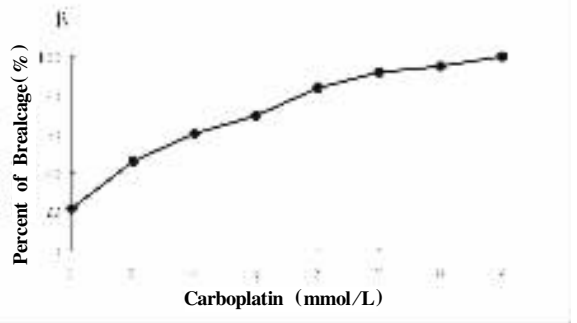
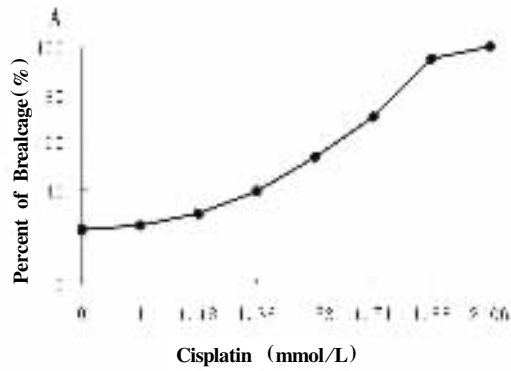


图 2. 顺铂、卡铂、双环铂致断 pBR322 质粒 DNA 的断裂率曲线图

Figure 2. The Break Effects of Cisplatin, Carboplatin and Dicycloplatin on pBR322 DNA

(A: Cisplatin B: Carboplatin C: Dicycloplatin)

卡铂。由于药物能使 DNA 形成交叉联结,故造成 DNA 断裂带呈拖尾样排列。

参考文献:

[1] 刘伟平,高文桂,普绍平,等. 治疗癌症的铂族金属配合物[J]. 药学进展,2001, 25(1):27-31.  
 [2] 陈启蒙. 抗癌药卡铂的临床应用进展[J]. 中国医师杂志,2000, 2(9):540-541.  
 [3] 杨一昆,普绍平,高文桂. 顺铂的应用及铂族金属抗癌药物的研究进展[J]. 中国新药杂志,1999, 8(12):797-800.  
 [4] 刘翔,卢景芬,刘世杰. 六价铬与烟溶液反应诱导质粒 DNA 单链断裂[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2000, 18(3):165-167.  
 [5] DaCruz Fresco P,Shacker J,Kortenkamp A. The reductive conversion of chromium(VI) by ascorbate gives rise to apurinic/apyrimidinic sites in isolated DNA[J]. Chem Res Toxicol, 1995,8:884-890.  
 [6] 卜书红,李方,王晶,等. 顺铂和卡铂对胃癌细胞系的毒性作用比较[J]. 医药导报,2001, 20(10):621-622.

上接第 211 页

用外,还有直接诱导凋亡的功能<sup>[14]</sup>。本试验结果提示铅可能通过 P53 的上调来诱导神经细胞凋亡。目前研究表明,铅可通过下调 bcl-2、上调 bax 基因的表达来诱导凋亡<sup>[2]</sup>,提示醋酸铅染毒后,使 P53 表达增加,进而启动 P53 与 bcl-2 结合,使 bcl-2 表达下降,bax 表达增加,进一步诱导细胞凋亡。

参考文献:

[1] 李宏,符绍莲. 铅的神经细胞发育毒性与谷胱甘肽水平的关系[J]. 中华预防医学杂志,2000, 34(2):98-100.  
 [2] 牛玉杰,张荣,程云会,等. 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡及 bcl-2, bax 基因表达的影响[J]. 中华预防医学杂志,2002, 36(1):30-33.  
 [3] Kaufman PL, Abelt BT, Cynader M. Introductory comments on neuroprotection[J]. Surv Ophthalmol, 1999, 43(Suppl 1):89-90.  
 [4] Osborne NN, Ugarte M, Chao M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma[J]. Surv Ophthalmol, 1999, 43(Suppl 1):102-128.  
 [5] Brune B, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis [J]. Eur J Pharmacol, 1998, 351:261-272.

[6] 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):3841.  
 [7] 杜卓民. 实用组织技术[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1998, 8-18.  
 [8] 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.  
 [9] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1991,40-46.  
 [10] 姜泊. 分子生物学常用实验方法[M]. 第1版. 北京:人民军医出版社,1996,170-183.  
 [11] 时胜利,陈自强,梁友信. 铅染毒对大鼠神经行为功能及神经化学的影响[J]. 中华预防医学杂志,1995,29:80-82.  
 [12] Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes [J]. J Immunol, 1995, 155:2858-2865.  
 [13] Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, et al. P53 expression in nitric oxide-induced apoptosis[J]. FEBS Lett, 1994, 355:23-26.  
 [14] Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, et al. Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13:711.