

慢性铅染毒致雄性小鼠肾损伤的机制： 基于环磷酸腺苷/蛋白激酶A信号通路

刘端亚¹, 余君¹, 樊勇胜¹, 李聪¹, 汪春红¹, 苏键镁²

1. 武汉大学健康学院, 湖北 武汉 430061

2. 湖北大学资源环境学院, 湖北 武汉 430061

摘要：

[背景] 铅染毒可引起肾脏损伤。研究表明环磷酸腺苷/蛋白激酶A (cAMP/PKA) 信号通路可通过调节氧化酶活性介导活性氧过量产生, 进而引起氧化应激和细胞凋亡。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 途径是肾脏活性氧的主要来源之一。

[目的] 探讨铅是否通过 cAMP/PKA 途径调节肾脏中 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 活性引起肾脏损伤。

[方法] 30 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠随机分为对照组和铅暴露组, 每组 15 只。通过自由饮水的方式进行铅暴露, 乙酸铅浓度分别为 0、200 mg·L⁻¹。连续染毒 90 d 后麻醉小鼠进行心脏采血, 取肾脏、称重, 计算脏器系数。采用石墨炉原子吸收分光光度计检测血液和肾脏中铅含量, HE 染色观察肾脏组织形态学改变, TUNEL 法检测肾细胞凋亡水平; 通过试剂盒检测肾组织中总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn-SOD) 活力, 谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和 cAMP 含量; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应法测定 PKA、NOX4 以及凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *caspase 3* mRNA 相对表达水平。

[结果] 两组小鼠体重和日饮水量差异无统计学意义。铅暴露组小鼠肾脏系数 [(0.89±0.02) %]、血铅 [(100.13±17.23) μg·L⁻¹] 和肾铅 [(2.58±0.21) μg·g⁻¹] 水平均高于对照组 [(0.78±0.02) %、(1.88±0.50) μg·L⁻¹、(0.04±0.01) μg·g⁻¹] (均 $P<0.05$)。铅暴露组小鼠肾脏近曲小管和肾小球形态学损伤明显, 细胞凋亡率高于对照组 [(0.013±0.003) %、(0.006±0.002) %]; 肾脏中 GSH 水平、T-SOD 和 Cu/Zn-SOD 活性降低 ($P<0.05$), MDA 含量升高 ($P<0.05$); *Bcl-2* mRNA 相对表达量及 *Bcl-2/Bax* 值下降, *caspase 3* mRNA 相对表达量则增高 ($P<0.05$); 肾组织中 cAMP 含量、PKA 和 NOX4 mRNA 相对表达量均升高, 且 NOX4 mRNA 相对表达量与 cAMP 含量之间呈正相关 ($r=0.486$, $P<0.05$)。

[结论] 铅可改变小鼠氧化酶 NOX4 活性, 引起肾脏组织损伤, 可能与 cAMP/PKA 信号通路有关。

关键词：铅; 肾脏; 环磷酸腺苷/蛋白激酶A; NADPH 氧化酶 4; 氧化损伤

Mechanism of kidney damage induced by chronic lead exposure in mice: Based on cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signaling pathway LIU Duan-ya¹, YU Jun¹, FAN Yong-sheng¹, LI Cong¹, WANG Chun-hong¹, SU Jian-mei² (1.School of Health Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430061, China; 2.Faculty of Resources and Environmental Science, Hubei University, Wuhan, Hubei 430061, China)

Abstract:

[Background] Lead can cause kidney damage. It has been shown that cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) signaling pathway can mediate reactive oxygen species (ROS) overproduction by regulating the activity of oxidase and then cause oxidative stress and apoptosis. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) pathway is one of the main sources of ROS in kidney.

[Objective] This experiment investigates whether lead cause kidney damage by regulating the activity of NADPH oxidase 4 (NOX4) through cAMP/PKA pathway.

[Methods] Thirty SPF ICR mice were randomly divided into a control group and a lead exposure group, with 15 mice in each group. The animals were given free drinking water containing 0 and 200 mg·L⁻¹ lead acetate, respectively. After 90 days of continuous exposure, the mice were anesthetized to collect heart blood and kidney samples, weigh organs, and calculate organ

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19812

基金项目

国家自然科学基金面上项目 (81773471)

作者简介

刘端亚 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: 2018203050019@whu.edu.cn

通信作者

汪春红, E-mail: wchunhong027@whu.edu.cn
苏键镁, E-mail: sujianmei88@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-11-26

录用日期 2020-03-22

文章编号 2095-9982(2020)06-0616-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

刘端亚, 余君, 樊勇胜, 等. 慢性铅染毒致雄性小鼠肾损伤的机制: 基于环磷酸腺苷/蛋白激酶A信号通路[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(6): 616-621.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19812

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Chun-hong, E-mail: wchunhong027@whu.edu.cn

SU Jian-mei, E-mail: sujianmei88@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-11-26

Accepted 2020-03-22

►To cite

LIU Duan-ya, YU Jun, FAN Yong-sheng, et al. Mechanism of kidney damage induced by chronic lead exposure in mice: Based on cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signaling pathway[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(6): 616-621.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19812

coefficients. The lead levels in both blood and kidney were measured with graphite furnace atomic absorption spectrometer. Renal histomorphology was observed by HE staining and apoptosis was detected by TUNEL. The activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), and the levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and cAMP were detected using corresponding kits. The relative mRNA expression levels of *PKA*, *NOX4*, *Bcl-2*, *Bax*, and *caspase3* were measured by quantitative real-time PCR.

[Results] There were no significant differences in body weight and daily water intake between the two groups. The renal coefficient $[(0.89 \pm 0.02)\%]$, blood lead level $[(100.13 \pm 17.23) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$, and renal lead level $[(2.58 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ in the lead exposure group were higher than those in the control group $[(0.78 \pm 0.02)\%, (1.88 \pm 0.50) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ and } (0.04 \pm 0.01) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ ($P < 0.05$). In the lead exposure group, the morphological damage of renal proximal convoluted tubules and glomeruli was obvious, and the apoptosis rate increased compared with the control group $[(0.013 \pm 0.003)\% \text{ vs. } (0.006 \pm 0.002)\%]$; the GSH level, T-SOD activity, and Cu/Zn-SOD activity in kidney decreased ($P < 0.05$), while the MDA content increased ($P < 0.05$); the relative expression level of *Bcl-2* mRNA and the ratio of *Bcl-2*/*Bax* decreased, and the relative expression level of *caspase3* mRNA increased ($P < 0.05$); the level of cAMP and the relative expression levels of *PKA* and *NOX4* mRNA in renal tissues increased, and there was a positive correlation between the relative expression level of *NOX4* mRNA and the level of cAMP ($r = 0.486, P < 0.05$).

[Conclusion] Lead can change the activity of *NOX4* and cause kidney damage, which is related to cAMP/*PKA* signaling pathway.

Keywords: lead; kidney; cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A; NADPH oxidase 4; oxidative damage

铅 (Pb) 是环境中常见的有毒重金属之一。铅经消化道、呼吸道及皮肤进入体内,可对多个器官和系统造成损伤^[1]。肾脏既是铅的主要排泄器官也是其毒作用靶器官^[2],研究显示血铅浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,即可引起肾脏病理改变和功能损伤^[3-4]。

流行病学调查资料和动物实验研究结果均表明,铅肾毒性机制与氧化应激效应密切相关^[5-6],其原因是铅暴露可增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平,破坏组织中氧化和抗氧化平衡,导致细胞氧化损伤和细胞凋亡^[7]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 途径是 ROS 的主要来源之一。NADPH 氧化酶有 7 种亚型,在肾脏中分布的主要是 NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, *NOX4*)^[8]。*NOX4* 活性改变可诱导肾脏氧化应激反应,引起组织损伤,并促进肾间质纤维化等疾病的进展^[9-10]。研究显示,铅可增加单核细胞中 *NOX4* 的含量,促进慢性阻塞性肺病的发展^[11],但铅暴露对肾脏中 *NOX4* 的影响尚未见报道。

环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/*PKA*) 信号通路是与氧化应激反应密切相关的主要环境传感机制之一^[12],cAMP/*PKA* 通路的失调可导致氧化酶活性增加,产生过量 ROS,进而引起氧化应激损伤,并促进细胞凋亡^[13]。本研究拟探讨低剂量铅暴露对小鼠肾脏的损伤及 cAMP/*PKA* 信号通路的影响,为探索铅肾毒性作用机制提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和饲养条件

从北京维通利华实验动

物技术有限公司购买 30 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠 (合格证号: 11400700321630), 3~4 周龄, 体重 $10 \sim 12 \text{ g}$ 。每笼 5 只, 将实验小鼠按照 SPF 级饲养标准喂养在屏障系统动物房, 12 h/12 h 昼夜交替, 温度为 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 湿度 50%~60%。动物实验根据武汉大学动物中心的实验动物使用计划执行, 实验过程中遵循动物伦理学要求, 本研究已获武汉大学医学部伦理委员会批准 (编号: 2019YF2027)。

1.1.2 试剂与仪器 乙酸铅、乙醇、氯化钠和硝酸 (国药集团化学试剂有限公司, 中国), 质量分数为 4% 的多聚甲醛/通用型组织固定液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国), 总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD)、铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn-superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国), 二喹啉甲酸蛋白测定试剂盒 (碧云天有限公司, 中国), 小鼠/大鼠 cAMP 检测试剂盒 (R&D Systems, 美国), 伊红染液、苏木素染液和 TUNEL 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国), Trizol 提取试剂 (Invitrogen, 美国), 转录试剂盒 (Takara, 日本), 引物由北京擎科生物科技有限公司设计并合成。

石墨炉原子吸收分光光度计 (型号: AA240FS-GTA120, Varian, 美国), 光学显微镜 (尼康, 日本), Synergy2 酶标仪 (BioTek, 美国), 荧光定量聚合酶链式反应仪 (型号: CFX 3.1, Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理和样本采集 世界卫生组织^[14]和中国^[15]都将 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为儿童及非职业铅接触人群血铅水平的参考值。据文献报道该剂量下能观察到人体

肾功能受损^[3-4],经饮水铅暴露($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)一定时间,鼠类血铅含量为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右^[16-17]。结合预实验和前期结果^[18],本研究仅选定 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为实验小鼠饮水途径铅染毒剂量,观察在接近人群血铅参考值水平的较低剂量铅对实验小鼠肾脏及cAMP/PKA途径的影响。

30只ICR小鼠随机分为两组,对照组和铅暴露组,每组15只。通过自由饮水的方式进行铅暴露,乙酸铅浓度分别设为0、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验期内每周称重、记录饮水和饲料消耗量。连续染毒90d后,异氟烷麻醉处死小鼠,心脏取血备用,取双侧肾脏称重,计算肾脏的脏器系数,脏器系数=脏器重量(g)/体重(g)×100%。每组小鼠取15个右侧肾脏和10个左侧肾脏置于冻存管中,液氮冷冻2h,然后转移至 -80°C 冰箱储存备用。另5只小鼠的左肾脏置于装有3mL 4%多聚甲醛/通用型组织固定液管中,于 4°C 保存。

1.2.2 血铅、肾铅含量检测 $100\text{ }\mu\text{L}$ 全血、 0.10 g 肾组织(均来自右侧肾脏)经65% HNO_3 和30% H_2O_2 热消解,放置过夜后赶酸,用0.5% HNO_3 定容至2mL。采用石墨炉原子吸收分光光度计($\lambda=283.3\text{ nm}$)测定样品光密度值,根据标准曲线计算样品铅浓度。在本实验中,测得方法的检出限为 $0.0949\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,加标回收率为96%~103%。

1.2.3 肾脏组织形态学的观察 每组各5个左侧肾脏经组织固定液在 4°C 固定24h后进行石蜡包埋与切片。行HE染色,光镜下观察并采集图像。

1.2.4 TUNEL法检测小鼠肾细胞凋亡水平 取肾组织石蜡切片,参照TUNEL试剂盒说明书染色,观察肾脏细胞凋亡情况。每张切片随机选择5个视野,通过Image J 1.47软件计算细胞凋亡率。

1.2.5 氧化和抗氧化指标测定 称取各组5只小鼠左侧肾脏 0.1 g ,加入 0.9 mL 生理盐水,机械匀浆。组织匀浆中T-SOD和Cu/Zn-SOD活性、GSH和MDA含量的测定均按照试剂盒说明书的方法进行。

1.2.6 肾组织cAMP含量检测 称取各组5只小鼠左侧肾脏 0.1 g ,按重量(g):体积(mL)=1:5的比例加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl机械匀浆,然后加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH中和匀浆液。采用酶联免疫吸附法检测组织匀浆中cAMP含量,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.7 目的基因mRNA水平检测 称取各组5只小鼠左侧肾组织 0.1 g ,依次进行RNA提取、RNA纯度及完整性的鉴定、cDNA合成,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测肾脏中氧化应激、凋亡等相关基因mRNA的水平。

引物序列见表1。

表1 小鼠肾脏氧化应激、凋亡相关基因qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences of renal genes related to oxidative stress and apoptosis of mice

基因名称	引物序列(5'-3')
PKA	正向引物: CTCTGGGACGGGTTCCTTTG
	反向引物: CTCTGGGACGGGTTCCTTTG
NOX4	正向引物: GAAGGGGTAAACACCTCTGC
	反向引物: ATGCTCTGCTTAAACACAATCCT
Bax	正向引物: TGAAGACAGGGGCTTTTGG
	反向引物: AATTGCGCGGAGACACTCG
Bcl-2	正向引物: ATGCTTTGTGGAACATATATGGC
	反向引物: GGTATGCACCCAGAGTGATGC
caspase3	正向引物: TGGTGATGAAGGGTCAATTATG
	反向引物: TTCGGCTTTCAGTCAGACTC
GAPDH	正向引物: AGGTCGGGTGTGAACGGATTGG
	反向引物: TGTAGACCATGTATGTTGAGGTCA

1.3 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 铅对小鼠肾脏脏器系数及血铅、肾铅水平的影响

在90d的实验期间,所有小鼠的日常活动和外观没有差异,均未出现死亡现象。铅暴露组小鼠体重 $[(42.59\pm 4.62)\text{ g}]$ 和日饮水量 $[(5.12\pm 0.40)\text{ mL}]$ 与对照组 $[(41.96\pm 5.14)\text{ g}$ 、 $(5.36\pm 0.53)\text{ mL}]$ 相比,差异均无统计学意义。但与对照组比较,铅暴露组小鼠肾脏的脏器系数上升($P<0.05$),血铅和肾铅含量均升高($P<0.05$)。见表2。

表2 90d铅暴露后小鼠肾脏脏器系数以及血铅和肾铅水平
($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

Table 2 Renal organ coefficient and lead levels in blood and kidney of mice following a 90-day lead exposure ($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	脏器系数/%	血铅浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	肾铅浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
对照组	0.78 ± 0.02	1.88 ± 0.50	0.04 ± 0.01
铅暴露组	$0.89\pm 0.02^*$	$100.13\pm 17.23^*$	$2.58\pm 0.21^*$

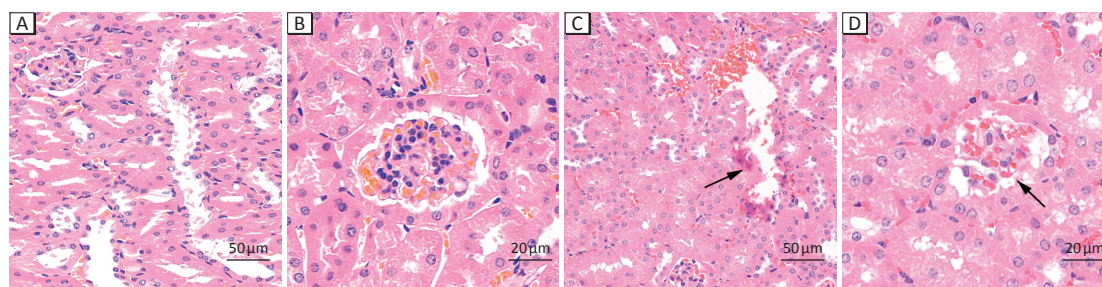
[注]*:与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 铅对小鼠肾脏组织损害及凋亡的影响

HE染色结果显示,对照组小鼠的近曲小管和肾小球结构正常,未发现细胞坏死(图1A和B);铅暴露组(图1C和D)近曲小管结构被破坏,上皮细胞充血、脱落,肾小球体积萎缩,出现空泡样变性,且肾小球毛细血管极度扩张,充满红细胞。图2为TUNEL法检

测肾脏细胞凋亡结果, 细胞核固缩且呈棕色为凋亡细胞。每组每张切片随机5个视野的观察结果显示, 铅

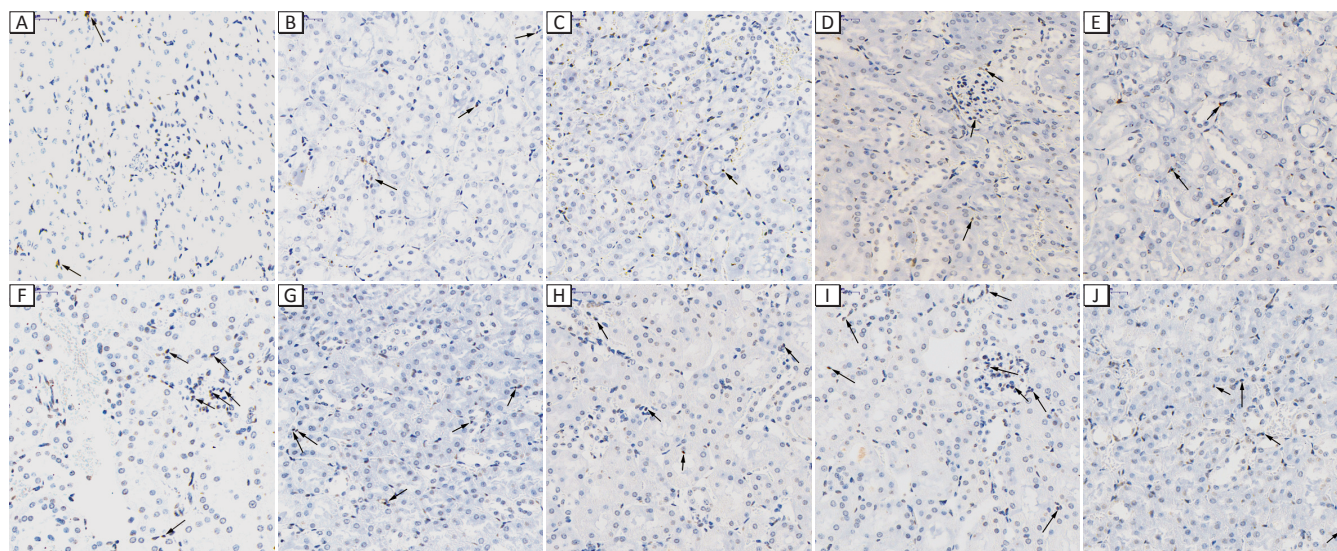
暴露组肾脏细胞凋亡率 $[(0.013 \pm 0.003) \%$ 高于对照组 $[(0.006 \pm 0.002) \%$, $P < 0.05$ 。



[注] A、B 分别对对照组近曲小管、肾小球；C、D 分别为铅暴露组近曲小管（箭头所指为结构破坏）、肾小球（箭头所指为空泡样变）。

图1 90d 铅暴露后小鼠肾脏组织的病理变化 (HE, $\times 200$)

Figure 1 Pathological changes in renal tissues of mice following a 90-day lead exposure (HE staining, $\times 200$)



[注] A~E：对照组；F~J：铅暴露组。箭头所指为凋亡细胞。

图2 90d 铅暴露后小鼠肾脏细胞凋亡情况 ($n=5$, TUNEL, $\times 200$)

Figure 2 Apoptosis in renal cells of mice following a 90-day lead exposure ($n=5$, TUNEL, $\times 200$)

2.3 铅对小鼠肾脏组织氧化应激的影响

铅暴露组肾脏组织中T-SOD、Cu/Zn-SOD活力均低于对照组 ($P < 0.05$)；与对照组相比, 铅暴露组GSH含量下降 ($P < 0.05$), 而MDA的含量升高 ($P < 0.05$)。见表3。

表3 90d 铅暴露后小鼠肾脏组织氧化应激指标结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	T-SOD活力/ U·mg ⁻¹	Cu/Zn-SOD活力/ U·mg ⁻¹	GSH含量/ μmol·g ⁻¹	MDA含量/ μmol·g ⁻¹
	(以蛋白计)	(以蛋白计)	(以蛋白计)	(以蛋白计)
对照组	22.44±0.43	15.21±0.20	4.20±0.49	2.06±0.24
铅暴露组	19.32±0.12*	13.06±0.43*	2.75±0.47*	2.44±0.23*

[注] *：与对照组比较, $P < 0.05$ 。

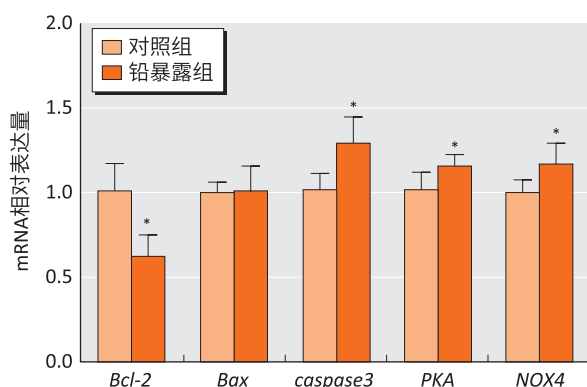
2.4 铅对小鼠肾脏组织抗凋亡和凋亡基因表达的影响

图3结果显示, 两组促凋亡基因Bax mRNA相

对表达量接近 ($P > 0.05$)；但铅暴露组抗凋亡基因Bcl-2 mRNA相对表达量低于对照组, Bcl-2/Bax值 (0.625 ± 0.102) 较对照组 (1.011 ± 0.169) 明显下降 ($t=4.372$, $P < 0.05$), 凋亡执行蛋白caspase3的mRNA相对表达量则高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.5 铅对小鼠肾脏组织cAMP含量、PKA和NOX4 mRNA水平的影响

铅暴露组cAMP的含量 $[(112.4 \pm 13.43) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 高于对照组 $[(82.14 \pm 7.36) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。铅暴露组PKA、NOX4 mRNA相对表达量 (1.16 ± 0.06 、 1.17 ± 0.13) 均高于对照组 (1.01 ± 0.11 、 1.00 ± 0.07) ($P < 0.05$)。见图3。相关分析显示NOX4 mRNA相对表达量与cAMP含量之间呈正相关 ($r=0.486$, $P < 0.05$)。



[注] *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图3 90d铅暴露后小鼠肾脏中相关基因mRNA相对表达量 (n=5)

Figure 3 Relative mRNA expression levels of genes in kidney of mice following a 90-day exposure (n=5)

3 讨论

目前我国非职业接触人群血铅参考值为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 但国外研究表明血铅浓度 $\geq 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可对儿童造成智力损伤^[19-20], 血铅浓度 $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 可影响人体肾脏功能^[3-4]。本研究建立 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铅饮水途径暴露模型, 小鼠血铅含量为 $(100.13 \pm 17.23) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在此低剂量铅暴露下肾脏组织即出现明显病理损伤, 并伴有氧化应激和细胞凋亡现象。尽管动物实验结果不能直接外推到人群, 但人比小鼠对毒物更敏感^[21], 提示我国现行人群血铅参考值的安全性有限。德国2010年取消血铅安全阈值的设定^[22], 美国2015年将成人血铅安全范围降为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[23]。

氧化应激反应的增强是铅诱导肾毒性的重要机制。研究表明铅可抑制谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和SOD等抗氧化酶的活性^[24]。铅还可直接产生ROS, 诱导脂质过氧化, 促使氧化应激和细胞凋亡的发生^[6]。本研究中各组小鼠体重变化差异无统计学意义, 而铅暴露组小鼠肾脏明显肿大, 抗氧化酶T-SOD、Cu/Zn-SOD活性降低、GSH水平降低, 脂质过氧化物MDA水平上升, 表明该水平铅暴露可导致小鼠肾组织氧化应激反应的发生, 这与其他文献报道一致^[25]。TUNEL结果显示肾细胞凋亡数量增加, qRT-PCR结果分析显示, 铅对促凋亡蛋白Bax mRNA表达量无明显影响, 但能下调抗凋亡相关蛋白Bcl-2 mRNA表达, Bcl-2/Bax值下降, 同时激活细胞内caspase3 mRNA表达, 导致肾细胞凋亡。

众所周知, 细胞内ROS来源于多种途径, 其中氧化酶被过度激活是氧化应激反应增强的重要过程^[8-9], NOX4与肾脏中ROS所致的氧化应激损伤密切相关^[26],

过量NOX4产生的 H_2O_2 , 导致肾脏氧化与抗氧化失衡, 促进多种肾脏疾病的发生^[27]。本研究显示, 铅暴露导致肾脏组织中NOX4 mRNA表达量升高, 提示NOX4过表达是铅肾损伤的重要因素。cAMP/PKA信号通路调节NOX4的表达, 破坏细胞氧化-抗氧化平衡^[28]。Fujimori等^[28]指出cAMP/PKA途径影响氧化酶途径的ROS生成机制, Qiao等^[29]研究发现在大鼠肾小管上皮细胞中阻断cAMP/PKA通路, NOX4的表达受抑制, 减轻了氧化损伤导致的肾纤维化。Shimizu等^[30]在人肾小管上皮细胞中发现cAMP可激活NOX4的表达。在本研究中, cAMP含量、PKA mRNA表达量也明显增加, 且NOX4 mRNA相对表达量与cAMP含量之间呈正相关, 故推测铅可能通过cAMP/PKA信号通路介导肾脏NOX4酶活性增加, 进而诱导肾脏氧化损伤。

综上所述, 低剂量铅暴露可导致小鼠肾脏氧化损伤及细胞凋亡。铅诱导肾脏细胞氧化酶NOX4表达增加, 破坏氧化和抗氧化平衡, 进而产生肾脏组织氧化应激效应和细胞凋亡现象; 在肾脏组织损伤过程中cAMP/PKA信号途径也受到影。

参考文献

- [1] DEBNATH B, SINGH W S, MANNA K. Sources and toxicological effects of lead on human health [J]. Indian J Med Specialit, 2019, 10 (2): 66-71.
- [2] NAKHAE S, AMIRABADIZADEH A, BRENT J, et al. Impact of chronic lead exposure on liver and kidney function and haematologic parameters [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 124 (5): 621-628.
- [3] FADROWSKI JJ, NAVAS-ACIEN A, TELLEZ-PLAZA M, et al. Blood lead level and kidney function in us adolescents: the third national health and nutrition examination survey [J]. Arch Intern Med, 2010, 170 (1): 75-82.
- [4] SPECTOR JT, NAVAS-ACIEN A, FADROWSKI J, et al. Associations of blood lead with estimated glomerular filtration rate using MDRD, CKD-EPI and serum cystatin C-based equations [J]. Nephrol Dialysis Trans, 2011, 26 (9): 2786-2792.
- [5] QU W, LI D G, FENG B, et al. Effects of oxidative stress on blood pressure and electrocardiogram findings in workers with occupational exposure to lead [J]. J Int Med Res, 2019, 47 (6): 2461-2470.
- [6] LOPES AC BA, PEIXE TS, MESAS AE, et al. Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2015, 236: 193-238.

- [7] 张浩, 刘汝涛, 魏云波. 重金属铅诱发机体氧化应激效应的研究进展 [J]. 科学与管理, 2016, 36 (5) : 49-57.
- [8] WAN C, SU H, ZHANG C. Role of NADPH oxidase in metabolic disease-related renal injury : an update [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016 : 7813072.
- [9] YANG Q, WU FR, WANG JN, et al. Nox4 in renal diseases : an update [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124 : 466-472.
- [10] 张丽, 乔晞. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶与肾间质纤维化 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2018, 7 (1) : 44-46.
- [11] GOGOI K, MANNA P, DEY T, et al. Circulatory heavy metals (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX4/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes [J]. Toxicol Vitro, 2019, 54 : 269-279.
- [12] BOUCHEZ C, DEVIN A. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) : a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway [J]. Cells, 2019, 8 (4) : 287.
- [13] FU X, BEER DG, BEHAR J, et al. cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (29) : 20368-20382.
- [14] WHO. Childhood lead poisoning [M]. Geneva : WHO, 2010 : 74.
- [15] 卫生部. 儿童高铅血症和铅中毒分级和处理原则 [R]. 北京 : 卫生部, 2006.
- [16] NIETO-FERNANDEZ FE, RUIZ A, NTUKOGU N, et al. Short term lead exposure induces a stress-like response in adult mice [J]. Med Sci Monit, 2006, 12 (10) : BR325-BR329.
- [17] YUN SW, GÄRTNER U, ARENDT T, et al. Increase in vulnerability of middle-aged rat brain to lead by cerebral energy depletion [J]. Brain Res Bull, 2000, 52 (5) : 371-378.
- [18] WANG Y, FANG Y Y, WANG C H. The chronic effects of low lead level on the expressions of Nrf2 and Mrp1 of the testes in the rats [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 35 (1) : 109-116.
- [19] MASON LH, HARP JP, HAN DY. Pb neurotoxicity : neuropsychological effects of lead toxicity [J]. Bio Med Res Int, 2014, 2014 : 840547.
- [20] EVENS A, HRYHORCZUK D, LANPHEAR BP, et al. The impact of low-level lead toxicity on school performance among children in the Chicago Public Schools : a population-based retrospective cohort study [J]. Environ Health, 2015, 14 (1) : 21.
- [21] 孙志伟. 毒理学基础 [M]. 第七版. 北京 : 人民卫生出版社, 2017.
- [22] WILHELM M, HEINZOW B, ANGERER J, et al. Reassessment of critical lead effects by the German Human Biomonitoring Commission results in suspension of the human biomonitoring values (HBM I and HBM II) for lead in blood of children and adults [J]. Int J Hyg Environ Health, 2010, 213 (4) : 265-269.
- [23] CDC. Adult Blood Lead Epidemiology and Surveillance (ABLES), Reference Blood Lead Levels (BLLs) for Adults in the U.S. [EB/OL]. [2020-04-17]. <https://www.cdc.gov/niosh/topics/ables/ReferenceBloodLevelsforAdults.html>.
- [24] SOUSSI A, GARGOURI M, EL FEKI A. Effects of co-exposure to lead and zinc on redox status, kidney variables, and histopathology in adult albino rats [J]. Toxicol Ind Health, 2018, 34 (7) : 469-480.
- [25] WANG L, WANG H, HU M, et al. Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead [J]. Arch Toxicol, 2009, 83 (5) : 417-427.
- [26] MENG XM, REN GL, GAO L, et al. NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via ROS-mediated programmed cell death and inflammation [J]. Lab Invest, 2018, 98 (1) : 63-78.
- [27] DREVET S, GAVAZZI G, GRANGE L, et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis [J]. Exp Gerontol, 2018, 111 : 107-117.
- [28] FUJIMORI N, OONO T, IGARASHI H, et al. Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase [J]. Peptides, 2011, 32 (10) : 2067-2076.
- [29] QIAO X, WANG L, WANG Y, et al. Intermedin inhibits unilateral ureteral obstruction-induced oxidative stress via NADPH oxidase Nox4 and cAMP-dependent mechanisms [J]. Renal Failure, 2017, 39 (1) : 652-659.
- [30] SHIMIZU H, SAITO S, HIGASHIYAMA Y, et al. CREB, NF- κ B, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304 (7) : C685-C692.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 陈姣)