

发育期不同阶段铅染毒及对应驱铅治疗对小鼠近远期认知的影响

张怡静^{1,2}, 周蕾蕾², 徐健^{1,2}, 颜崇淮², 段燕红³, 曹晓华³

1. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院/上海市胚胎源性疾病重点实验室, 上海 200030
2. 上海交通大学医学院附属新华医院/教育部和上海市环境与儿童健康重点实验室, 上海 200092
3. 华东师范大学生命科学学院/教育部和上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21070

摘要:

[背景] 铅损害儿童的认知发育, 但发育期铅暴露是否损害中老年阶段的认知功能, 及络合治疗是否减轻发育期铅暴露诱发的认知损害的研究相对较少。

[目的] 探讨小鼠发育期不同阶段(包括哺乳期、断乳期和性成熟早期)铅暴露及驱铅治疗对小鼠近期和远期认知功能影响的差异。

[方法] 分别选取哺乳期、断乳期和性成熟早期(2、21 和 41 日龄) C57BL/6 雄鼠各 30 只, 随机均分为 3 组(对照组、铅暴露组和铅暴露后驱铅组)。其中, 10 只为对照组, 给予标准饲料和去离子水饲养; 10 只为铅暴露组, 另 10 只为铅暴露后驱铅组, 后 2 组均先给予标准饲料和含醋酸铅饮用水(母鼠剂量为 0.1%, 幼鼠为 0.05%), 自由饮水摄入, 染毒 19 d 后, 铅暴露后驱铅组小鼠再灌胃给予二巯基丁二酸($1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 共 6 d)。驱铅结束后(在实验开始 25 d 后)检测各组小鼠的血铅水平; 小鼠 75 日龄时进行 Morris 水迷宫实验, 记录定位航行试验(75~79 日龄)的逃避潜伏期, 探索试验(80 日龄)的目标象限探索时间和穿台次数来分析对近期认知的影响; 小鼠 365 日龄时, 测量海马长时程增强表达, 诱导各组小鼠离体脑片的 fEPSP 幅度来分析铅对远期认知的影响。

[结果] 各发育阶段 3 组幼鼠的血铅水平有差异($F_{\text{哺乳期}}=43.47$, $F_{\text{断乳期}}=228.6$, $F_{\text{性成熟早期}}=274.2$, 均 $P<0.001$)。各发育阶段铅暴露组幼鼠的血铅水平均高于各自对照组水平(哺乳期、断乳期和性成熟早期血铅质量浓度(后称浓度)均数分别为 386.4 、 265.0 、 $178.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 均 $P<0.001$); 驱铅后与各相应阶段的铅暴露组相比, 血铅水平明显下降(哺乳期、断乳期和性成熟早期染毒驱铅后的血铅浓度均数分别为 28.68 、 47.29 、 $20.93 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, P 均 <0.001), 且哺乳期铅暴露幼鼠经过驱铅后下降幅度最大(哺乳期、断乳期、性成熟早期分别下降 92.58%、82.15%、88.25%, $P<0.01$)。水迷宫实验中, 哺乳期铅暴露组小鼠的逃避潜伏期随着训练天数的增加而下降的进展(从第 1 天的 54.20 s 到第 5 天的 30.54 s, 降幅 43.65%) 比对照组(从第 1 天的 32.44 s 到第 5 天的 15.20 s, 降幅 53.14%) 缓慢($P<0.01$), 在目标象限探索时间占比降低($P<0.05$); 经过驱铅治疗后, 铅暴露后驱铅组小鼠的逃避潜伏期随着训练天数增加而下降的进展(从第 1 天的 40.91 s 到第 5 天的 20.87 s, 降幅 48.99%), 较铅暴露组小鼠加快($P<0.05$)。而断乳期和性成熟早期铅暴露组小鼠随着训练天数的增加, 逃避潜伏期变化趋势及在目标象限探索时间占比、穿越平台次数与对照组相比, 差异均没有统计学意义(均 $P>0.05$); 驱铅治疗后, 断乳期和性成熟早期铅暴露后驱铅组小鼠与铅暴露组小鼠的上述三项指标的差异也均无统计学意义($P>0.05$)。长时程增强实验中, 因样本数量有限, 将各发育阶段的对照组、铅暴露组和铅暴露后驱铅组的样本分别合并, 分析发现: 对照组、铅暴露组、铅暴露后驱铅组诱导的 fEPSP 幅度差异具有统计学意义($F_{\text{组间}}=212.2$, $F_{\text{时间}}=11.36$, $P<0.001$); 分析各组小鼠海马脑片记录的后 10 min 诱发的平均幅度后发现, 铅暴露组诱发的 fEPSP 幅度低于对照组($P<0.05$); 经过驱铅后, 铅暴露后驱铅组小鼠脑片诱导的 fEPSP 幅度无明显增加($P>0.05$)。进一步观察数据发现: 哺乳期铅暴露组小鼠诱发的 fEPSP 幅度比对照组下降了 27.2%, 断乳期或性成熟早期铅暴露组小鼠的 fEPSP 幅度与相应对照组相比差别不大; 哺乳期铅暴露后驱铅组小鼠的 fEPSP 幅度较铅暴露组提高了 44.3%, 而断乳期和性成熟早期铅暴露后驱铅组的 fEPSP 幅度与相应铅暴露组相比无明显差别。

[结论] 不同发育阶段铅暴露对幼鼠的认知功能均有影响, 以哺乳期铅暴露诱发的近期和远

基金项目

国家自然科学基金项目 (81373016, 81974486)

作者简介

张怡静(1995—), 女, 硕士生;
E-mail: sharemine@126.com

通信作者

徐健, E-mail: sonia0616@sjtu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-02-23

录用日期 2021-07-15

文章编号 2095-9982(2021)11-1251-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张怡静, 周蕾蕾, 徐健, 等. 发育期不同阶段铅染毒及对应驱铅治疗对小鼠近远期认知的影响 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(11): 1251-1257.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21070

Funding

This study was funded.

Correspondence to

XU Jian, E-mail: sonia0616@sjtu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-02-23

Accepted 2021-07-15

To cite

ZHANG Yijing, ZHOU Leilei, XU Jian, et al. Effects of lead exposure and chelation therapy in different developmental stages on mouse short-term and long-term cognitive functions[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(11): 1251-1257.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21070

期影响最为明显。驱铅治疗可以部分改善铅的近期和远期认知损伤,以哺乳期驱铅效果最明显。

关键词: 铅; 2, 3 二巯基丁二酸; 络合治疗; 不同发育阶段; 认知功能; 长时程增强电位

Effects of lead exposure and chelation therapy in different developmental stages on mouse short-term and long-term cognitive functions ZHANG Yijing^{1,2}, ZHOU Leilei², XU Jian^{1,2}, YAN Chonghui², DUAN Yanhong³, CAO Xiaohua³ (1. International Peace Maternity & Child Health Hospital/Shanghai Key Laboratory of Embryo Original Diseases, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 2. Xinhua Hospital/MOE-Shanghai Key Lab of Children's Environmental Health, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 3. School of Life Sciences/Brain Functional Genomics, Ministry of Education/Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract:

[Background] Lead (Pb) exposure impairs cognitive functions of children. Whether Pb exposure in different developmental stages induces long-term cognitive impairment, and whether chelation therapy could mitigate the cognitive impairment is rarely reported.

[Objective] This experiment is designed to investigate effects of Pb exposure and chelation therapy during different developmental stages (breastfeeding, weaning, and early puberty periods) on mouse short-term and long-term cognitive functions.

[Methods] C57BL/6 male mice in breastfeeding period, weaning period, and early puberty period (postnatal day 2, 21, and 41; PND 2, PND 21, and PND 41, $n=30$, respectively) were randomly divided into control, Pb exposure, and Pb+dimercaptosuccinic acid (DMSA) treatment groups ($n=10$ in each group). The control groups received standard food and deionized water. The Pb exposure mice received standard food and free drinking water containing Pb acetate (0.1% for dams, and 0.05% for pups). After receiving Pb acetate for 19 d, the Pb+DMSA treatment groups were given $1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ DMSA for 6 d with gastric infusion. Whole blood Pb levels were measured after DMSA treatment on experimental day 25. The effects on short-term cognitive function were tested in the Morris Water Maze task by the analyses of escape latency on PND 75–79, as well as target quadrant time and times of platform-crossing on PND 80. Hippocampal long-term potentiation of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) of mice on PND 365 was induced to demonstrate the effects on long-term cognitive function.

[Results] The blood Pb levels among the Pb, Pb+DMSA, and control groups were statistically different for each developmental stage ($F_{\text{breastfeeding period}}=43.47$, $F_{\text{weaning period}}=228.6$, $F_{\text{early period of puberty}}=274.2$, all $P<0.001$). Compared to the counterpart control groups, blood Pb levels of the Pb exposure groups (386.4 , 265.0 , and $178.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in breastfeeding period, weaning period, and early puberty period, respectively) were significantly higher for all stages. After the chelation therapy, the blood Pb significantly decreased for all stages (28.68 , 47.29 , and $20.93 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the three periods, respectively, all $P<0.001$) and the Pb levels of the mice exposed in the breastfeeding period decreased most (by 92.58%, 82.15%, and 88.25% in the three periods, respectively, $P<0.01$). In the water maze task, the mice exposed to Pb in the breastfeeding period had a gentler decrease in escape latency (from 54.20 s on day 1 to 30.54 s on day 5, by 43.65 % decrease) than the control group (from 32.44 s on day 1 to 15.20 s on day 5, by 53.14 % decrease) ($P<0.01$) and a significant decrease in target quadrant time ($P<0.05$). After the chelation therapy, the escape latency of the DMSA-treated mice in the breastfeeding period (from 40.94 s on day 1 to 20.87 s on day 5, by 48.99 % decrease) was steeper than that of the Pb-exposed mice ($P<0.05$). The differences in the escape latency, target quadrant time, and times of platform-crossing were not significant between the Pb-exposed mice and the control mice in the weaning period and early period of puberty (all $P>0.05$). After the chelation therapy, such differences were also not significant compared with before therapy. Due to the small sample size, data were merged for different developmental stages in the long-term potentiation test. The amplitudes of fEPSP induced in the control, Pb-exposed, and DMSA treatment groups were significantly different ($F_{\text{groups}}=212.2$, $F_{\text{time}}=11.36$, $P<0.001$). The average fEPSP amplitude induced in the last 10 min recorded in the hippocampal slices in the Pb exposure group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). After the DMSA treatment, no significant differences were observed in the fEPSP amplitudes between the Pb exposure group and the DMSA treatment group ($P>0.05$). When observing the fEPSP data by developmental stages, the fEPSP amplitude in the breastfeeding Pb-exposure group was 27.2% lower than that of the breastfeeding control group, while such changes were not obvious in the weaning period or in the early period of puberty. The fEPSP amplitude in breastfeeding DMSA treatment group was 44.3% higher than that of the breastfeeding Pb exposure group, while such changes were not observed in the weaning period or in early period of puberty.

[Conclusion] Pb exposure during different developmental stages, especially in breastfeeding period, could affect short-term and long-term cognitive functions of mice. The harmful effects may be partially reversed by DMSA chelation therapy, especially being treated in breastfeeding period.

Keywords: lead; 2,3-dimercaptosuccinic acid; chelation therapy; different developmental stages; cognitive function; long-term potentiation

铅(Pb)是危害环境和人体健康最常见的一种重金属污染物。儿童是铅暴露的高风险人群,其神经系

统对发育期铅暴露极为敏感^[1-2]。铅可以替代钙离子通过钙通道穿过血脑屏障^[3],影响神经元和神经胶质

细胞的迁移、分化等^[3]。动物研究表明,铅暴露会直接损害海马和皮层神经元的长时程增强电位(long-terms potentiation, LTP)^[4],而 LTP 被认为是学习记忆的基础^[5]。流行病学研究表明,发育期低水平铅暴露与智力受损、运动技能(速度和灵活性)和记忆能力障碍明显相关^[6-7]。

目前铅中毒治疗主要通过重金属络合剂,其中 2,3-二巯基丁二酸(2,3-dimercaptosuccinic, DMSA)通过活泼的巯基(-SH)选择性地与铅结合成稳定的水溶性络合物后经肾脏排出,对其他微量元素的干扰较小,不良反应少,应用较为广泛^[8]。DMSA 理论上可以降低分布在啮齿动物神经系统内的铅浓度^[9],可能是通过改变中枢神经系统与血液之间的铅浓度梯度从而从中枢神经系统去除铅^[10]。本研究团队过往的动物实验表明,不同发育阶段的小鼠遭受的铅暴露对骨代谢损害的程度不同,且不同发育阶段驱铅治疗对逆转骨代谢损害的效果也不同^[11]。但目前探讨不同发育阶段铅暴露以及驱铅治疗对于发育期儿童近期和远期认知行为影响差异的研究较少。

因此,本研究拟建立发育期不同阶段铅暴露与驱铅治疗的小鼠模型,并追踪至老年期,比较发育期不同阶段铅中毒及驱铅治疗对小鼠近期和远期神经认知的影响差异。

1 对象与方法

1.1 实验动物和分组

研究分为哺乳期(出生后 2~20 日龄)、断乳期(出生后 21~40 日龄)和性成熟早期(出生后 41~60 日龄)三个阶段。选取 2、21 日龄和 41 日龄的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6 健康幼雄鼠[动物生产许可证号:SYXK(沪)2013-0106]为研究对象。每阶段均为 30 只小鼠,各阶段幼鼠随机分为对照组($n=10$)、铅暴露组($n=10$)和铅暴露后驱铅组($n=10$)。实验在上海交通大学医学院附属新华医院模式动物中心进行。实验过程中保持在 $(22\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 的温度、50%~70%的相对湿度和 12h/12h 的光照/黑暗循环的条件下,可以自由食用标准饲料。所有动物饲养和实验操作均遵从实验动物福利和伦理规范(伦理审批号:No.XHEC-F-2021-055)。

1.2 发育期不同阶段铅暴露及驱铅治疗的动物模型建立

哺乳期铅暴露及驱铅模型:对照组仔鼠出生后哺乳期母鼠和断乳后的幼鼠始终给予标准饲料和去离

子水饲养。铅暴露组哺乳期母鼠自由摄入 0.1%醋酸铅溶液(以往研究发现孕妇的血铅水平是母乳铅水平的 2 倍^[12]),19 d 后幼鼠断奶。哺乳期铅暴露小鼠再按驱铅与否随机分为 2 个亚组,每组 10 只。非驱铅组的幼鼠给予标准饲料和去离子水继续饲养;而驱铅组幼鼠用 $1\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ DMSA 溶液灌胃治疗 6 d 后,给予标准饲料和去离子水自由饮水继续饲养。

断乳期、性成熟早期铅暴露及驱铅模型:21 日龄和 41 日龄对照组幼鼠始终给予标准饲料和去离子水饲养,铅暴露组幼鼠通过自由饮水暴露于 0.05%醋酸铅溶液 19 d,随后分为两个亚组,非治疗组($n=10$)和驱铅组($n=10$),后续过程同哺乳期。

1.3 静脉血铅的测定

实验操作均在超净台上进行,超净台提前使用 75%酒精擦拭。小鼠麻醉后用一次性无菌注射器垂直穿刺心脏,采集 0.5 mL 全血后注入 2%乙二胺四乙酸二钠抗凝真空采血管, 4°C 保存。采用石墨炉原子吸收法检测全血中铅质量浓度(后称浓度)。将全血充分混匀后,取 40 μL 全血加入稀释液 360 μL ,稀释,充分混匀。超过标准曲线线性范围时加大稀释倍数,质控品处理同上述样品处理方法,将处理好的样品移至 1.5 mL 样品杯中,按编号顺序置于样品盘上,以去离子水作为空白对照,进行测定。仪器自动计算样品中铅的浓度。最小检测限量为 $0.01\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验室为血铅检测可信赖实验室。

1.4 Morris 水迷宫 (Morris Water Maze, MWM) 检测

MWM 被认为是检验啮齿动物学习记忆能力的经典模型^[13-14]。实验在一个圆形的水池(直径 100 cm,高 50 cm,深 30 cm)里进行,四周悬挂四个明显的标志物,上方悬挂有一个摄像头记录小鼠的运动轨迹(上海欣软信息科技有限公司,中国)。MWM 分为定位航行试验和空间探索试验,每组 4~5 只小鼠。小鼠 72 日龄始,每天轻微抚摸小鼠 5 min,使小鼠熟悉操作者的气味、抓取手法等。在行为学实验阶段,每天提前 1 h 将小鼠放入行为学房间适应,以减少非特异性刺激对实验的影响。在定位航行实验开始前,将平台放置在水上 2 cm,测试各组小鼠从其余 3 个象限到达平台的逃避潜伏期、游泳速度和游泳距离,排除各组小鼠在视力和体力上的差别后进行后续实验。(1)定位航行试验:从 75~79 日龄,每只小鼠每天进行 4 次,共训练 5 d。每天将小鼠分别从水池的 4 个不同的象限面朝池壁放入,若小鼠在 60 s 内找到隐藏在水下 2 cm 的平台并在平台上停留 3 s,则录制停止,将此时间记

为逃避潜伏期;若小鼠未在 60 s 内找到平台,则引导小鼠至平台上,让其在平台上停留 20 s,并将此次试验的逃避潜伏期记为 60 s。(2)空间探索试验:在定位航行试验结束 24 h 后(80 日龄),撤去平台,随机选择一象限将小鼠放入水池,记录小鼠在 60 s 内各个象限的航行时间。

1.5 LTP 测定

小鼠满 365 日龄,进行 LTP 测定。使用离体脑片场电位记录来探究发育期铅暴露以及驱铅治疗的远期效应。

1.5.1 离体脑片的制备 提前配置好 1 L 人工脑脊液的切片液(内含以下成分,数量单位均为 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$:氯化胆碱,110;氯化钾,2.5;氯化钙,0.5;硫酸镁,7;碳酸氢钠,25;磷酸钠,1.25;D-葡萄糖,25。pH 值 7.4)和 1 L 人工脑脊液的孵育液(内含以下成分,数量单位均为 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$:氯化钠,119;氯化钙,2.5;氯化钾,2.5;硫酸镁,1.3;碳酸氢钠,26.2;磷酸钠,1.0;D-葡萄糖,11。pH 值 7.4)。切片液冰上放置预冷,通 95%氧气/5%二氧化碳使氧饱和,保持低温。孵育液置于 30°C 恒温槽中,通氧。小鼠麻醉后固定,开胸,切片液灌流至鼻内流出,迅速断头,剥出脑组织,修块后粘在振动切片机的切片槽的底盘上,设定厚度为 380 μm ,切取到含海马的脑冠状脑片后迅速取出放入孵育液中,30°C 高温恢复 1 h,常温孵育 1 h 备用。

1.5.2 LTP 的诱导和记录 记录槽通入加氧饱和的孵育液,设置蠕动泵的流速为 $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。放置脑片于其上,将刺激电极-钨电极置于海马 CA3 区域,将装有电极内液(成分为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠和 2%台盼蓝)的记录电极置于海马 CA1 区域(图 1),记录场电位兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)。记录基线 15 min 后,给予 3 串 100 Hz 刺激,每串含 200 个脉冲,串间隔 10 s,以能引起 50%最大 fEPSP 幅度为诱导成功。诱导成功后持续记录 45 min。

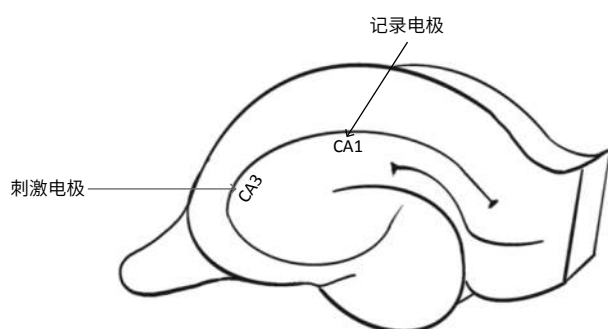


图 1 小鼠脑片海马电极位置示意图

Figure 1 The diagrammatic sketch of hippocampal electrode positions in mouse hippocampal slices

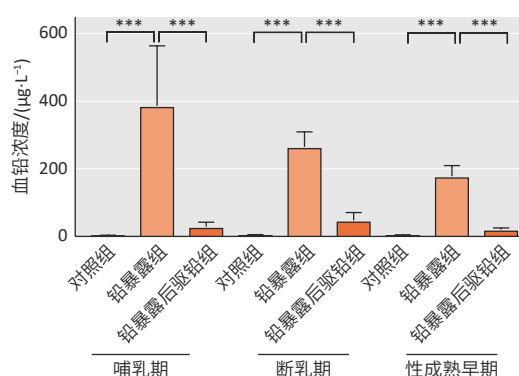
1.6 统计学分析

采用 Graphpad 8.0 对数据进行统计分析。三组及三组以上的组间差异采取单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。LTP 的数据由 pClamp 10.2 软件进行采集和分析。fEPSP 诱导幅度整体以及分年龄阶段分析时以($\bar{x}\pm s$)表示。组间的诱导幅度均值的比较用双因素方差分析进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同发育阶段小鼠血铅水平以及驱铅后血铅水平的比较

图 2 显示:各发育阶段中,对照组、铅暴露组和铅暴露后驱铅组血铅水平的差异有统计学意义($F_{\text{哺乳期}}=43.47, P<0.001$; $F_{\text{断乳期}}=228.6, P<0.001$; $F_{\text{性成熟早期}}=274.2, P<0.001$)。铅暴露后,各铅暴露组的血铅水平比相应对照组均升高(哺乳期、断乳期和性成熟早期血铅浓度均数分别为 386.4、265.0、178.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 均 $P<0.001$);驱铅后,各阶段驱铅组的血铅水平降低(哺乳期、断乳期和性成熟早期染毒后驱铅组的血铅浓度均数分别为 28.68、47.29、20.93 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 均 $P<0.001$),且哺乳期驱铅后血铅水平下降的幅度超过了断乳期和性成熟早期驱铅后的血铅下降幅度(下降幅度:哺乳期 92.58%,断乳期 82.15%,性成熟早期 88.25%, $P<0.01$),这说明与断乳期以及性成熟早期相比,在哺乳期进行驱铅的效率相对最高。



[注] ***: $P<0.001$ 。

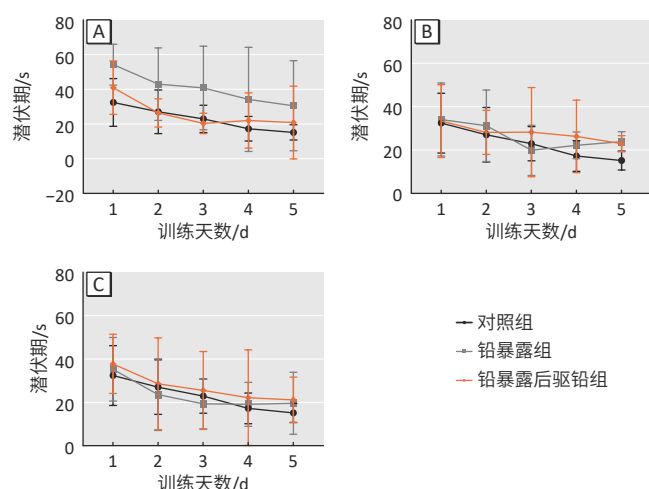
图 2 发育期不同阶段小鼠铅暴露后以及铅暴露驱铅后的血铅浓度($n=10$)

Figure 2 Blood lead levels of mice after lead exposure and chelation therapy in different developmental stages ($n=10$)

2.2 铅暴露对不同发育阶段小鼠学习记忆的短期影响

2.2.1 水迷宫定位航行试验 在定位航行训练中,各组的重复测量分析结果显示(图 3):各组组内的逃避

潜伏期随着训练天数的递增而逐渐下降 ($F = 6.453$, $P_{\text{时间}} < 0.001$)。双因素重复测量方差分析显示,与对照组相比,哺乳期铅暴露组小鼠的逃避潜伏期随着训练天数增加而下降的进展(从第 1 天的 54.20 s 到第 5 天的 30.54 s,降幅 43.65%) 比对照组(从第 1 天的 32.44 s 到第 5 天的 15.20 s,降幅 53.14%) 缓慢($P < 0.01$);且经过 DMSA 驱铅治疗后,哺乳期铅暴露后驱铅组小鼠的潜伏期随着训练天数增加而下降的进展(第 1 天的 40.91 s 到第 5 天的 20.87 s,降幅 48.99%) 较铅暴露组小鼠加快($P < 0.05$, 图 3A)。而断乳期和性成熟早期铅暴露后驱铅组和未驱铅组之间,随着训练天数增加,逃避潜伏期没有明显下降(图 3B 和图 3C, 均 $P > 0.05$)。



[注] A: 哺乳期; B: 断乳期; C: 性成熟早期。

图 3 定位航行试验显示发育期各阶段对照组、铅暴露组和铅暴露后驱铅组的逃避潜伏期变化趋势 ($n=5$)

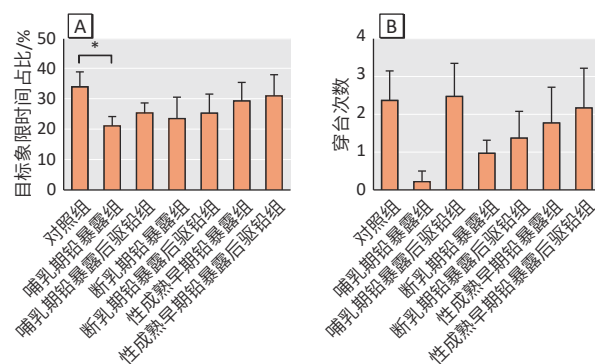
Figure 3 Escape latency of control, Pb exposure, and DMSA treatment groups in different developmental stages ($n=5$)

2.2.2 水迷宫空间探索实验 撤去平台后,记录小鼠在 60s 内的运动轨迹后分析发现:与对照组相比,哺乳期铅暴露组小鼠在目标象限时间占比降低($P < 0.05$, 图 4A),穿台次数差异未呈现统计学意义($P > 0.05$, 图 4B);经过驱铅治疗后,在目标象限时间占比差异未见统计学意义($P > 0.05$, 图 4A);而断乳期和性成熟早期阶段,各组间相应的差异均无统计学意义($P > 0.05$, 图 4A)。

2.3 不同发育阶段铅暴露对小鼠学习记忆的远期影响

因各发育阶段的样本量较少,将各发育阶段的对照组、铅暴露组及铅暴露后驱铅组分别合并,形成总的对照组、铅暴露组、铅暴露后驱铅组。两因素方差分析发现:各组(对照组、铅暴露组、铅暴露后驱铅组)组间与时间因素差异呈现统计学意义($F_{\text{组间}}=212.2$, $F_{\text{时间}}=$

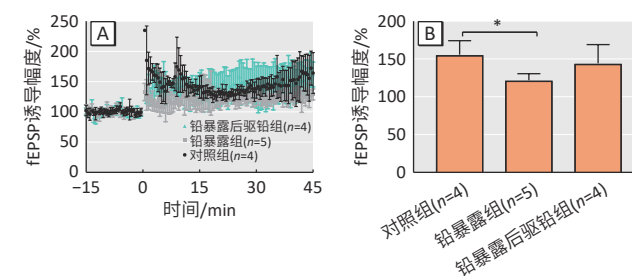
11.36, 均 $P < 0.001$, 图 5A)。进一步统计各组小鼠海马脑片记录的后 10 min 诱发的平均 fEPSP 幅度(图 5B)发现:高频刺激后,铅暴露组小鼠海马诱发的 fEPSP 幅度与对照组相比降低($P < 0.05$),驱铅治疗后,铅暴露后驱铅组小鼠脑片诱导的 fEPSP 幅度和铅暴露组相比无明显差别($P > 0.05$)。



[注] *: $P < 0.05$ 。

图 4 各组目标象限时间占探索总象限的时间百分比(A)和平台穿越次数(B)

Figure 4 Target quadrant time (A) and times of platform-crossing (B) of mice after different treatments in different developmental stages



[注] *: $P_{\text{对照组 vs 铅暴露组}} < 0.05$ 。

图 5 各组小鼠(365 日龄)离体脑片的 fEPSP 诱导幅度(A)和后 10 min 的平均 fEPSP 幅度(B)(均为相对于基线的%)

Figure 5 Time course of fEPSP amplitude (A) and average fEPSP amplitude of last 10-min recording (B) in relative to baseline (%) in control, Pb exposure, and DMSA treatment groups (PND 365)

为进一步观察不同发育阶段的效果,将哺乳期铅暴露组和铅暴露后驱铅组小鼠从总的铅暴露组和铅暴露后驱铅组中分离出来,比较哺乳期与断乳期和性成熟早期处理效果的差别。结果发现:哺乳期驱铅组小鼠的 LTP 高于哺乳期铅暴露组的 LTP 水平;而断乳期或性成熟早期驱铅组诱发的 LTP 与对应的铅暴露组相比差别不大;统计各组小鼠海马脑片记录的后 10 min 诱发的平均幅度发现,与对照组相比,哺乳期铅暴露组小鼠诱发的 fEPSP 幅度减弱了 27.2%,而断乳期和性成熟早期铅暴露组小鼠诱发的 fEPSP 幅度改变不明显。经过驱铅后,哺乳期驱铅组小鼠的 fEPSP 诱发幅度较铅暴露组提高了 44.3%,而断乳期和性成熟早

期驱铅组小鼠的诱发幅度与对应的铅暴露组相比无明显差别,这说明铅暴露对哺乳期小鼠海马的 fEPSP 影响最明显,且 DMSA 驱铅可部分逆转此损伤,而断乳期和性成熟早期铅暴露和驱铅,对小鼠海马的 fEPSP 改变效果甚微。但关于各发育阶段 LTP 水平的分析,因样本量有限,未进行统计学分析。

3 讨论

环境中的重金属污染是全世界持续关注的一个热点问题^[15-17]。本研究从幼鼠生命早期发育的不同阶段出发,将发育期分为哺乳期、断乳期和性成熟早期,探究不同发育阶段的铅暴露及驱铅治疗对小鼠认知功能的近期影响的差异,并追踪至小鼠的老年阶段,探究生命早期不同阶段铅暴露和驱铅治疗后对幼鼠中老年阶段远期认知记忆的影响。既往流行病学调查发现血铅浓度与儿童智商的负相关关系可能与性别有关,可能在男孩中更明显^[18-19],动物研究也发现性别影响大鼠铅染毒后的表现遗传学变化^[20],因此本研究只采用雄性幼鼠开展研究。

本研究发现:与对照组相比,哺乳期、断乳期和性成熟早期铅暴露损害了雄性幼鼠的学习和记忆功能,其中以哺乳期铅暴露损害最为明显。DMSA 驱铅可以部分缓解此种损害效应,且哺乳期驱铅后学习记忆改善最明显。另外发现发育期铅暴露使老年期时诱发的海马 fEPSP 幅度较对照组低,驱铅治疗后诱导的海马脑片 fEPSP 幅度上升,且哺乳期驱铅后的上升最明显,这提示哺乳期铅中毒后及早干预和治疗对尽可能减少远期学习记忆损伤可能具有积极作用,作用强度高于断乳期和性成熟早期铅暴露后驱铅引发的作用强度。各发育阶段铅暴露后铅的吸收率和神经损伤敏感性不同。在相同暴露环境下,与成人相比,幼儿被证实铅的吸收率更高(40%~50% VS 成人的 10%~15%)^[21],这或许与幼儿的肠道系统尚未完善相关。另外与年龄较大的儿童相比,发育早期的血脑屏障还不是很成熟^[22]。

生命早期铅暴露诱发的学习记忆损害和治疗后学习记忆的改善效应可能一直维持到中老年时期,这与以往的研究一致^[23]。过往的动物研究也发现,与中年期铅中毒的小鼠相比,在幼年时铅中毒的小鼠在老年阶段的学习或记忆能力上可能有更明显的损害^[24]。人群研究也发现,儿童期铅暴露可能会增加成人神经退行性疾病的风险^[25]。在新西兰进行的一项 1037 名 11 岁儿童的前瞻性队列研究发现,儿童铅暴露水平与成年后的认知功能下降、智商降低相关^[26],进一步研

究发现,儿童期铅暴露与成年期的髓鞘形成改变和轴突完整性改变相关^[27],与成年后调节认知行为的特定脑区的脑容量发生改变明显相关^[28]。推测可能的机制有:(1)铅暴露干扰脑中锌指蛋白与 DNA 的结合^[29]。锌指蛋白是转录因子的特异性序列 DNA 结合所需的主要结构基础,此两者的结合与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDAR)基因的表达相关,而 NMDAR 是突触后膜参与突触可塑性调控的受体^[30]。说明发育早期铅暴露可以通过 SP1 等脑基因的转录调控干扰小鼠的脑发育;(2)铅进入中枢神经系统后可以与蛋白质的巯基牢固结合并且与第二信使钙(Ca^{2+})竞争^[31],影响神经元的信号和神经递质传递;还可以通过诱导氧化应激,破坏钙稳态^[32],最终导致细胞凋亡。一项关于大鼠不同发育阶段(产前和产后)铅暴露对单胺氧化酶的活性影响的研究证明:铅暴露使得处于发育阶段尤其是出生后早期阶段(2 周龄前)大鼠的大部分脑区的单胺氧化酶活性升高,且随着大鼠大脑发育成熟,铅毒性逐渐降低^[9, 33]。可以推测:发育早期铅暴露引发的单胺氧化酶活性的增加可能会使神经行为发生变化,如诱发注意力缺陷及多动症等认知行为的变化。

本研究创新性地在以往的研究基础上分析了不同发育阶段铅暴露和驱铅治疗对认知功能影响的差异,并且追踪至中老年阶段,探讨效应的长远性,为临床上铅中毒的治疗时机提供了研究数据,也为回答发育早期铅中毒的认知损害以及驱铅治疗的维持效果提供了基础实验结果支撑。本研究建议对发育期铅中毒,尤其是哺乳期铅中毒尽早治疗,以防止铅暴露对神经认知的损伤效应持续到中老年期,产生更多的中老年神经认知领域的疾病负担。

参考文献

- [1] NEEDLEMAN H. Low level lead exposure: history and discovery[J]. *Ann Epidemiol*, 2009, 19(4): 235-238.
- [2] LIN Y, HUANG L, XU J, et al. Blood lead, bone lead and child attention-deficit-hyperactivity-disorder-like behavior[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 659: 161-167.
- [3] LIDSKY TI, SCHNEIDER JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates[J]. *Brain*, 2003, 126(Pt1): 5-19.
- [4] SALEHI I, KARAMIAN R, KOMAKI A, et al. Effects of vitamin E on lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Brain Res*, 2015, 1629: 270-281.
- [5] NABAVI S, FOX R, PROULX CD, et al. Engineering a memory with LTD and LTP[J]. *Nature*, 2014, 511(7509): 348-352.
- [6] CHIODO LM, JACOBSON SW, JACOBSON JL. Neurodeve-

- lopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2004, 26(3): 359-371.
- [7] MIN MO, SINGER LT, KIRCHNER HL, et al. Cognitive development and low-level lead exposure in poly-drug exposed children[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2009, 31(4): 225-231.
- [8] APOSHIAN H V. DMSA and DMPS-water soluble antidotes for heavy metal poisoning[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1983, 23: 193-215.
- [9] FLORA SJ S, MITTAL M, MEHTA A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy[J]. *Indian J Med Res*, 2008, 128(4): 501-523.
- [10] BRADBERRY S, VALE A. Dimercaptosuccinic acid (succimer; DMSA) in inorganic lead poisoning[J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2009, 47(7): 617-631.
- [11] ZHANG Y, ZHOU L, LI S, et al. Impacts of lead exposure and chelation therapy on bone metabolism during different developmental stages of rats[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 183: 109441.
- [12] ETTINGER AS, TÉLLEZ-ROJO MM, AMARASIRIWARDENA C, et al. Levels of lead in breast milk and their relation to maternal blood and bone lead levels at one month postpartum[J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(8): 926-931.
- [13] VORHEES CV, WILLIAMS MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [14] VORHEES CV, WILLIAMS MT. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 45: 75-90.
- [15] REHMAN K, FATIMA F, WAHEED I, et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 157-184.
- [16] TONG S, VON SCHIRNDING YE, PRAPAMONTOL T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions[J]. *Bull World Health Organ*, 2000, 78(9): 1068-1077.
- [17] LANPHEAR BP, RAUCH S, AUINGER P, et al. Low-level lead exposure and mortality in US adults: a population-based cohort study[J]. *Lancet Public Health*, 2018, 3(4): e177-e184.
- [18] DESROCHERS-COUTURE M, OULHOTE Y, ARBUCKLE TE, et al. Prenatal, concurrent, and sex-specific associations between blood lead concentrations and IQ in preschool Canadian children[J]. *Environ Int*, 2018, 121(Pt2): 1235-1242.
- [19] ZHOU CC, HE YQ, GAO ZY, et al. Sex differences in the effects of lead exposure on growth and development in young children[J]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126294.
- [20] SINGH G, SINGH V, WANG ZX, et al. Effects of developmental lead exposure on the hippocampal methylome: influences of sex and timing and level of exposure[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 290: 63-72.
- [21] ZIEGLER EE, EDWARDS BB, JENSEN RL, et al. Absorption and retention of lead by infants[J]. *Pediatr Res*, 1978, 12(1): 29-34.
- [22] 付大千, 李华强, 史源, 等. 脑发育不同阶段低水平铅暴露对大鼠空间学习记忆能力的影响及海马CA1区超微结构的变化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2002, 17(1): 27-29.
FU DG, LI HQ, SHI Y, et al. Effects of lead exposure at different developmental stages on spatial learning and memory in rats and its microstructural changes in the region CA1 of the hippocampus[J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2002, 17(1): 27-29.
- [23] ORTEGA DR, RODRÍGUEZ PO, 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.
- [24] BIHAQI SW, BAHMANI A, SUBAIEA GM, et al. Infantile exposure to lead and late-age cognitive decline: relevance to AD[J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(2): 187-195.
- [25] REUBEN A. Childhood lead exposure and adult neurodegenerative disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 64(1): 17-42.
- [26] REUBEN A, CASPI A, BELSKY DW, et al. Association of childhood blood lead levels with cognitive function and socioeconomic status at age 38 years and with IQ change and socioeconomic mobility between childhood and adulthood[J]. *JAMA*, 2017, 317(12): 1244-1251.
- [27] BRUBAKER CJ, SCHMITHORST VJ, HAYNES EN, et al. Altered myelination and axonal integrity in adults with childhood lead exposure: a diffusion tensor imaging study[J]. *Neuro-Toxicology*, 2009, 30(6): 867-875.
- [28] CECIL KM, BRUBAKER CJ, ADLER CM, et al. Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure[J]. *PLoS Med*, 2008, 5(5): e112.
- [29] CRUMPTON T, ATKINS DS, ZAWIA NH, et al. Lead exposure in pheochromocytoma (PC12) cells alters neural differentiation and Sp1 DNA-binding[J]. *NeuroToxicology*, 2001, 22(1): 49-62.
- [30] CUI B, WU M, SHE X. Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus[J]. *J Occup Health*, 2009, 51(2): 152-158.
- [31] FLORA SJ S, SAXENA G, MEHTA A. Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: role of reactive oxygen species and intracellular Ca^{2+} [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(1): 108-116.
- [32] FLOREA AM, BÜSSELBERG D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds[J]. *Biometals*, 2006, 19(4): 419-427.
- [33] NOWAK P, SZCZERBAK G, NITKA D, et al. Effect of prenatal lead exposure on nigrostriatal neurotransmission and hydroxyl radical formation in rat neostriatum: dopaminergic-nitric interaction[J]. *Toxicology*, 2008, 246(1): 83-89.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)