

低浓度铅和高脂饲料对大鼠肝脏的影响

朱为梅, 赵红宇, 杨海清, 罗宇超, 李学章

云南省第三人民医院职业病科(云南省职业病医院), 云南 昆明 650011

摘要:

[背景] 慢性低浓度铅(后简称“低铅”)中毒已成为影响人们健康的一大疾病,尤其是当肝脏自身受到炎症、脂肪等浸润时,其排铅能力明显降低,会加重肝脏的损害,其作用机制可能与细胞凋亡有关。

[目的] 本研究拟从肝细胞凋亡途径探讨低铅对非酒精性脂肪肝病大鼠的影响,以进一步明确低铅在肝脏损害中的作用。

[方法] 适应性喂养2周后,60只SD大鼠随机均分为4组,为普通饲料组(后称“普通组”)、低铅普通饲料组(后称“低铅组”)、高脂饲料组(后称“高脂组”)和低铅高脂饲料组(后称“低铅高脂组”),每组15只。相应饲料喂养8周后处死。采集肝脏和血液,检测血铅和肝铅含量,观察光镜下肝脏形态学变化,观察其肝功能指标[血清谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)]、抗氧化指标[血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和总抗氧化能力(T-AOC)],并采用Western blot和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测凋亡相关Bax、bcl-2、P53和Fas蛋白和mRNA的表达。

[结果] 低铅组和低铅高脂组大鼠血铅和肝铅含量明显高于普通组($P < 0.05$),且低铅高脂组血铅[(0.31 ± 0.10) mg/L]和肝铅[(3.37 ± 1.12) mg/L]明显高于低铅组[(0.26 ± 0.10) mg/L, (2.42 ± 0.87) mg/L] ($P < 0.05$)。HE染色显示:普通组大鼠肝脏细胞排列紧密,细胞核大小均一;低铅组看不出明显损伤;高脂组和低铅高脂组有明显脂肪空泡,特别是低铅高脂组,脂肪空泡数量更多,表明大鼠非酒精性脂肪肝病模型建成。低铅组、高脂组和低铅高脂组ALT和AST均明显高于普通组($P < 0.05$);高脂组和低铅高脂组ALT和AST明显高于低铅组($P < 0.05$);低铅高脂组ALT和AST明显高于高脂组($P < 0.05$)。低铅组SOD、GSH、T-AOC和MDA与普通组没有差异;相较于普通组,高脂组和低铅高脂组SOD、GSH和T-AOC明显降低($P < 0.05$),MDA明显升高($P < 0.05$);相较于低铅普通组,高脂组和低铅高脂组SOD、GSH和T-AOC明显降低($P < 0.05$),MDA明显升高($P < 0.05$);相较于高脂组,低铅高脂组SOD、GSH和T-AOC明显降低($P < 0.05$),MDA明显升高($P < 0.05$)。Western Blot和RT-PCR分析结果可见:P53、Fas和Bax表达,普通组和低铅组没有差异,而高脂组和低铅高脂组高于普通组和低铅组($P < 0.05$),低铅高脂组(p53、Fas和Bax蛋白分别为: 1.57 ± 0.14 、 1.16 ± 0.08 和 1.34 ± 0.12 ;mRNA分别为: 3.35 ± 0.14 、 2.52 ± 0.08 和 2.25 ± 0.06)高于高脂组(p53、Fas和Bax蛋白分别为: 1.35 ± 0.10 、 0.98 ± 0.06 和 1.15 ± 0.09 ;mRNA分别为: 2.75 ± 0.16 、 1.82 ± 0.04 和 1.72 ± 0.05) ($P < 0.05$);bcl-2蛋白表达,普通组和低铅组没有差异,高脂组(0.52 ± 0.05)和低铅高脂组(0.50 ± 0.04)低于普通组(1.18 ± 0.04)和低铅组(1.14 ± 0.03) ($P < 0.05$),低铅高脂组和高脂组没有差异;而低铅高脂组的bcl-2 mRNA表达低于其余3组($P < 0.05$)。

[结论] 低浓度铅可致非酒精性脂肪肝病大鼠肝功能异常,降低其抗氧化能力,这可能与低铅可以加重非酒精性脂肪肝病大鼠肝细胞凋亡有关。

关键词: 低铅;高脂;非酒精性脂肪肝;肝细胞凋亡

Effects of low-lead and high-fat diet on rat liver ZHU Wei-mei, ZHAO Hong-yu, YANG Hai-qing, LUO Yu-chao, LI Xue-zhang (Department of Occupational Diseases, The Third People's Hospital of Yunnan Province/Yunnan Occupational Disease Hospital, Kunming, Yunnan 650011, China)

Abstract:

[Background] Chronic low lead poisoning affects human health; especially when liver is experiencing inflammatory and fatty infiltration, it removes less lead and the damage aggravates, which may be related to cell apoptosis.

[Objective] This study is designed to investigate the effects of low lead on hepatocyte apoptosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and clarify the role of low lead in liver damage.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18644

基金项目

云南卫生科技计划项目(2016NS336)

作者简介

朱为梅(1972—),女,学士,副主任医师;
E-mail: 13888593721@139.com

通信作者

朱为梅, E-mail: 13888593721@139.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-09-30

录用日期 2019-01-15

文章编号 2095-9982(2019)05-0490-06

中图分类号 R135; R232

文献标志码 A

引用

朱为梅, 赵红宇, 杨海清, 等. 低浓度铅和高脂饲料对大鼠肝脏的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(5): 490-495.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18644

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHU Wei-mei, E-mail: 13888593721@139.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2018-09-30

Accepted 2019-01-15

To cite

ZHU Wei-mei, ZHAO Hong-yu, YANG Hai-qing, et al. Effects of low-lead and high-fat diet on rat liver[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(5): 490-495.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18644

[Methods] After two weeks of adaptive feeding, 60 rats were randomly divided into four groups: normal diet group, low Pb group, high fat diet group, and low Pb+high fat diet group, with 15 rats in each group. They were sacrificed after feeding with corresponding diet plans for eight weeks. Liver and blood samples were collected to detect blood and liver lead levels, liver function indices [aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT)], and antioxidant indices [superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and total antioxidant capacity (T-AOC)], as well as to observe liver pathological alteration under light microscope. The protein and mRNA expressions of Bax, bcl-2, P53, and Fas were measured by Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

[Results] The levels of blood lead and liver lead in the low Pb group and the low Pb+high fat diet group were significantly higher than those in the normal diet group ($P<0.05$), and the levels in the low Pb+high fat diet group [blood lead: (0.31 ± 0.10) mg/L; liver lead: (3.37 ± 1.12) mg/L] were significantly higher than those in the low Pb group [blood lead: (0.26 ± 0.10) mg/L; liver lead: (2.42 ± 0.87) mg/L] ($P<0.05$). The results of HE staining showed that cells on rat liver in the normal diet group were closely arranged with uniform nucleus size; the low Pb group did not show obvious damage; the high fat diet group and the low Pb+high fat diet group showed fat vacuoles, especially the low Pb+high fat diet group, indicating an established rat model of NAFLD. For AST and ALT, the low Pb group, the high fat diet group, and the low Pb+high fat diet group showed higher levels than the normal diet group ($P<0.05$); the high fat diet group and the low Pb+high fat diet group showed higher levels than the low Pb group ($P<0.05$); the low Pb+high fat diet group showed higher levels than the high fat diet group ($P<0.05$). Compared with the normal diet group, the low Pb group had no differences in SOD, GSH, T-AOC, and MDA, but the high fat diet group and the low Pb+high fat diet group showed reduced SOD, GSH, and T-AOC ($P<0.05$) and increased MDA ($P<0.05$). Compared with the low Pb group, the high fat diet group and the low Pb+high fat diet group showed decreased SOD, GSH, and T-AOC ($P<0.05$) and increased MDA ($P<0.05$). Compared with the high fat diet group, the low Pb+high fat diet group showed reduced SOD, GSH, and T-AOC ($P<0.05$) and elevated MDA ($P<0.05$). According to the results of Western blot and RT-PCR, the expressions of P53, Fas, and Bax between the normal diet group and the low Pb group were not different; but the high fat diet group and the low Pb+high fat diet group showed significantly higher levels of the expressions than the normal diet group and the low Pb group ($P<0.05$), and the low Pb+high fat diet group (protein expression levels of p53, Fas, and Bax were 1.57 ± 0.14 , 1.16 ± 0.08 , and 1.34 ± 0.12 , respectively; mRNA expression levels were 3.35 ± 0.14 , 2.52 ± 0.08 , and 2.25 ± 0.06 , respectively) showed significantly higher levels of the expressions than the high fat diet group (protein expression levels of p53, Fas, and Bax were 1.35 ± 0.10 , 0.98 ± 0.06 , and 1.15 ± 0.09 , respectively; mRNA expression levels were 2.75 ± 0.16 , 1.82 ± 0.04 , and 1.72 ± 0.05 , respectively) ($P<0.05$). The expressions of bcl-2 protein between the normal diet group and the low Pb group were not different, but the high fat diet group (0.52 ± 0.05) and the low Pb+high fat diet group (0.50 ± 0.04) showed significantly lower levels than the normal diet group (1.18 ± 0.04) and the low Pb group (1.14 ± 0.03) ($P<0.05$), and there was no difference between the low Pb+high fat diet group and the high fat diet group; the low Pb group showed significantly lower level of expression of bcl-2 mRNA than the other three groups ($P<0.05$).

[Conclusion] Low lead can exacerbate liver dysfunction and decrease antioxidant capacity in rats with NAFLD, which may be related to aggravated hepatocyte apoptosis induced by low lead.

Keywords: low lead; high fat diet; non-alcoholic fatty liver; hepatocyte apoptosis

随着我国城市现代化和工业化进程的加快,慢性低浓度铅(后简称“低铅”)中毒已经成为影响人们健康的一大疾病^[1]。相关流行病学调查研究显示,目前我国慢性低铅中毒呈地域集中性且有逐渐增高趋势^[2]。2016年对云南省某市进行的大范围流行病学调查显示,当地慢性低铅中毒呈广泛流行,但在分析统计结果时发现一个有趣的现象,即虽然慢性低铅中毒的患病率高(人体血铅 ≥ 2.9 $\mu\text{mol/L}$ 或尿铅 ≥ 0.58 $\mu\text{mol/L}$ 即可判定为慢性铅中毒),但是肝脏疾病的发生率相较于正常人群并没有明显升高^[3]。临床发现慢性低铅中毒的肝脏损伤相较于正常人群治疗和康复更为困难,因此推测人体对铅有一定的排除功能,即使低铅状态持续存在,对肝脏的损害也并不大;但是当肝脏自身受到炎症、脂肪等浸润时,肝脏排铅能力会明显降低,最终反作用加重肝脏的损害,而这一途径可能与细胞凋亡有关^[4]。近年有部分研究显示,环境中长期低铅接触可导致人类或实验动物机体多种细胞凋亡^[5]。其原因可能与铅毒物增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平,同时减少

抗氧化物质的浓度或活性,破坏体内氧化和抗氧化平衡,导致细胞氧化损伤有关,而低铅中毒是否有同样的作用还缺少相关实验数据证实,为此本研究拟探讨低铅和(或)高脂饲料对大鼠肝脏的作用,同时采用Western blot和逆转录-聚合酶链反应检测凋亡相关蛋白和mRNA的表达特点,从细胞凋亡途径探讨低铅中毒对肝脏损伤的影响,为今后慢性低铅中毒的防治提供基本的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和饲养条件 清洁级SD大鼠60只,雌雄各半,大鼠体重160~180g,购于昆明医科大学动物实验中心(动物合格证号:SCXY2014-007)。动物实验经云南省第三人民医院伦理委员会审批,饲养温度控制为18~26°C,湿度控制为55%~65%,光照和黑暗时间均为12h。

1.1.2 实验材料 垫料、普通饲料和高脂饲料均由昆明医科大学动物实验中心配置和提供;醋

酸铅购于武汉博士德生物公司；谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 和谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 试剂盒购于中生北控生物科技股份有限公司；测定采用雅培 C8000 全自动生化仪购于美国雅培 (中国) 有限公司；胰岛素检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司；超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 以及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒购于南京生物工程研究所；铅测定试剂盒购于汇智泰康生物技术 (北京) 有限公司；肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53, P53)、自杀相关因子 (factor associated with suicide, Fas)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, bcl-2)、bcl-2 相关 x 蛋白 (bcl-2 associated x protein, Bax) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体购于美国 Santa 公司, 相应二抗购于北京中山金桥公司, 总 RNA 提取试剂盒购于北京天根生物公司；引物由上海生物生工设计并制作；乙醇、二甲苯等试剂为实验室自有, 超纯水 (HFB 型超纯水仪, 上海惠分科学分析仪器有限公司) 和去离子水 (HK-10 小型去离子水仪, 华南高科水处理设备杭州有限公司) 由实验室自制。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 60 只大鼠均于适应性喂养 2 周后随机分为普通饲料组 (饲料配方构成为玉米 73.5%、麦麸 20%、鱼粉 5%、谷粉 1%、食盐 0.5%, 后称“普通组”)、低铅普通饲料组 (质量分数为 3/万含醋酸铅普通饲料, 后称“低铅组”)、高脂饲料组 (饲料配方构成为普通饲料 78.8%、胆固醇 1%、牛胆盐 0.2%、蛋黄粉 10%、猪油 10%, 后称“高脂组”) 和低铅高脂饲料组 (3/万含醋酸铅高脂饲料, 后称“低铅高脂组”), 每组 15 只。

1.2.2 标本采集 相应饲料喂养 8 周后, 大鼠隔夜禁食 12 h, 于次日分批次以 4% 的水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉处死, 沿腹中线剖开取出肝脏, 然后使用 10 mL 注射器下腔腹主动脉取血。肝脏取出后, 统一切取肝左叶放入 4% 的多聚甲醛溶液中保存备用, 其余肝脏组织则置于 -86°C 超低温冰箱中保存, 待相关蛋白和 mRNA 的检测。血液分为 2 部分, 其中一部分保存于抗凝管中行相关肝功能的测定, 其余血液采用 4000 r/min 低温离心机 (离心半径 10 cm) 离心, 收集上清液待相关抗氧化指标的测定。

1.2.3 肝脏组织病理学观察 病理学检测采用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 肝脏组织用多聚

甲醛固定 24~72 h 后, 分批次取出, 自来水反复冲洗后采用梯度酒精脱水, 完成后石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色完成后, 光镜下观察并收集图像。脂肪肝造模成功标准为病理学检查结果显示肝脏组织有明显的脂肪颗粒浸润。

1.2.4 血清学指标测定 AST 和 ALT 的测定采用全自动生化仪。血清氧化和抗氧化能力指标 SOD、MDA、GSH 以及 T-AOC 的测试均依据试剂盒检测, 检测方法严格按照试剂盒提供的说明书进行, SOD 采用酶标仪, MDA、GSH 和 T-AOC 采用分光光度计进行测定。

1.2.5 蛋白表达 称取 100 mg 肝脏组织置入 1 mL 组织裂解液中充分裂解后离心收集上清液, 聚氰基丙烯酸正丁酯 (bicinchoninic acid, BCA) 法定量调平后。每组各取 50 μg 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电泳完成后转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 取出后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 洗涤 3 次后加入一抗 [P53 (1 : 2000)、Fas (1 : 3000)、bcl-2 (1 : 5000)、Bax (1 : 3000) 和 β -actin (1 : 5000)], 4°C 冰箱中过夜孵育; 次日洗涤 3 次后, 加入二抗 (1 : 5000) 孵育 1 h、洗涤后暗室曝光压片。凝胶图像分析系统检测蛋白质印迹条带灰度, 每组实验重复 3 次。

1.2.6 mRNA 表达 依据试剂盒说明书, 采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后, 定量并调平, 采用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒将其逆转录为 cDNA, 后进行扩增反应, 反应条件为: 95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 31 s, 共 40 个循环。计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值, 各组大鼠 P53、Fas、bcl-2 和 Bax 的 mRNA 相对表达量。引物设计为如表 1 所示。

表 1 引物序列表

基因	引物序列	扩增产物长度 (bp)
P53	正向引物: 5'-CTGCTGCTGACAGCTGAAA-3'	259
	反向引物: 5'-AGCGCTTCTCAATGCCATTG-3'	
Fas	正向引物: 5'-TTGATGGCTCACACACCTACG-3'	380
	反向引物: 5'-GTTGTAATC GGCACCCAAGTC-3'	
bcl-2	正向引物: 5'-CACATCATGAAGGAGGACG-3'	275
	反向引物: 5'-GCTATCACACAGCTGGGTC-3'	
Bax	正向引物: 5'-CACATCAAGATGGAGGACG-3'	275
	反向引物: 5'-GCTATCACACGCTGGGTC-3'	
β -actin	正向引物: 5'-TAGTTGCGTTACACCTTTC-3'	122
	反向引物: 5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'	

1.3 统计学分析

所有数据均采用SPSS 20.0统计学软件分析, 计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 使用单因素方差分析进行实验组间比较, 组间两两比较用 q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

普通组和低铅组大鼠状态良好, 饮食正常, 毛色光滑, 同时反应也较为灵敏, 而高脂组和低铅高脂组则出现明显的精神萎靡、活动减少, 毛色柔顺感降低, 脱毛且毛色发黄。在整个实验期内, 各组均没有大鼠死亡。从大鼠日常活动和外观上显示, 普通组和低铅组没有差异, 高脂组和低铅高脂组也没有差异。

2.2 大鼠血铅和肝铅

各组大鼠血铅和肝铅质量浓度比较, 差异有统计学意义 ($F=34.368$ 和 21.442 , $P=0.000$)。相较于普通组, 低铅组和低铅高脂大鼠的血铅和肝铅浓度明显升高 ($P<0.05$); 相较于低铅组, 低铅高脂组血铅和肝铅明显升高 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血铅和肝铅质量浓度 ($n=15$, mg/L)

组别	血铅	肝铅
普通组	0.11±0.06	0.88±0.37
低铅组	0.26±0.10*	2.42±0.87*
高脂组	0.12±0.11	0.95±0.43
低铅高脂组	0.31±0.10**^	3.37±1.12**^
F	34.368	21.442
P	0.000	0.000

[注] *: 与普通组相比, $P<0.05$; #: 与低铅组相比, $P<0.05$; ^: 与高脂组相比, $P<0.05$ 。

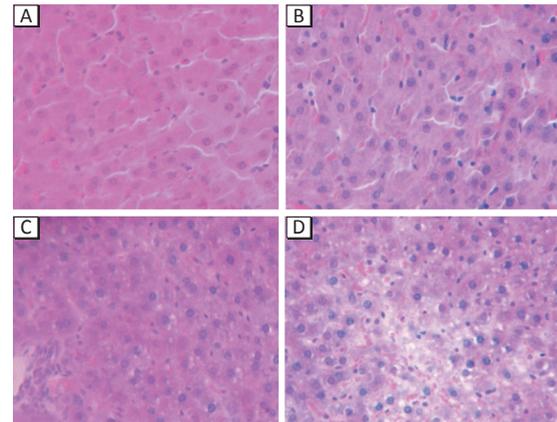
2.3 大鼠肝脏病理学变化

大鼠肝脏切片 HE 染色可见: 普通组表面光滑, 细胞排列紧密, 细胞核大小基本均一; 低铅组结构有一定的紊乱, 但是细胞核大小也基本均一, 看不出有明显的损伤; 高脂组和低铅高脂组则出现明显脂肪空泡, 虽然空泡较小, 但是分布较多, 此外也可以看出二者均有一定的炎症反应, 特别是低铅高脂组, 脂肪空泡数量更多也更大, 炎症反应也更为严重, 表明大鼠非酒精性脂肪肝造模成功。见图 1。

2.4 大鼠肝功能变化

各组大鼠肝功能指标 AST 和 ALT 比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=30.165$ 和 21.485 , $P=0.000$)。相较于普通组, 低铅组、高脂组和低铅高脂组大鼠肝功能指标 ALT 和 AST 均明显升高 ($P<$

0.05); 相较于低铅组, 高脂组和低铅高脂组大鼠 ALT 和 AST 明显升高 ($P<0.05$); 相较于高脂组, 低铅高脂组二者也有升高 ($P<0.05$)。见表 3。



[注] A: 普通组; B: 低铅组; C: 高脂组; D: 低铅高脂组。

图 1 各组大鼠肝脏组织 HE 染色图片 ($\times 400$)

表 3 各组大鼠肝功能指标比较 ($n=15$, U/L)

组别	ALT	AST
普通组	71.65±4.12	155.36±15.56
低铅组	79.56±8.54*	171.78±12.11*
高脂组	95.62±9.24**	194.28±17.35**
低铅高脂组	121.45±17.85**^	226.51±19.25**^
F	30.165	21.485
P	0.000	0.000

[注] *: 与普通组相比, $P<0.05$; #: 与低铅组相比, $P<0.05$; ^: 与高脂组相比, $P<0.05$ 。

2.5 大鼠氧化应激指标的变化

各组大鼠氧化应激指标 SOD、GSH、T-AOC 和 MDA 比较, 差异有统计学意义 ($F=12.167$ 、 16.784 、 21.652 和 18.805 , $P=0.000$)。相较于普通组, 低铅组大鼠各指标并没有明显变化, 而高脂组和低铅高脂组血清氧化应激指标 SOD、GSH、T-AOC 明显降低, MDA 明显升高 ($P<0.05$); 相较于低铅组, 高脂组和低铅高脂组大鼠 SOD、GSH 和 T-AOC 明显降低, MDA 明显升高 ($P<0.05$); 相较于高脂组, 低铅高脂组大鼠 SOD、GSH 和 T-AOC 进一步降低, MDA 也进一步升高 ($P<0.05$)。详见表 4。

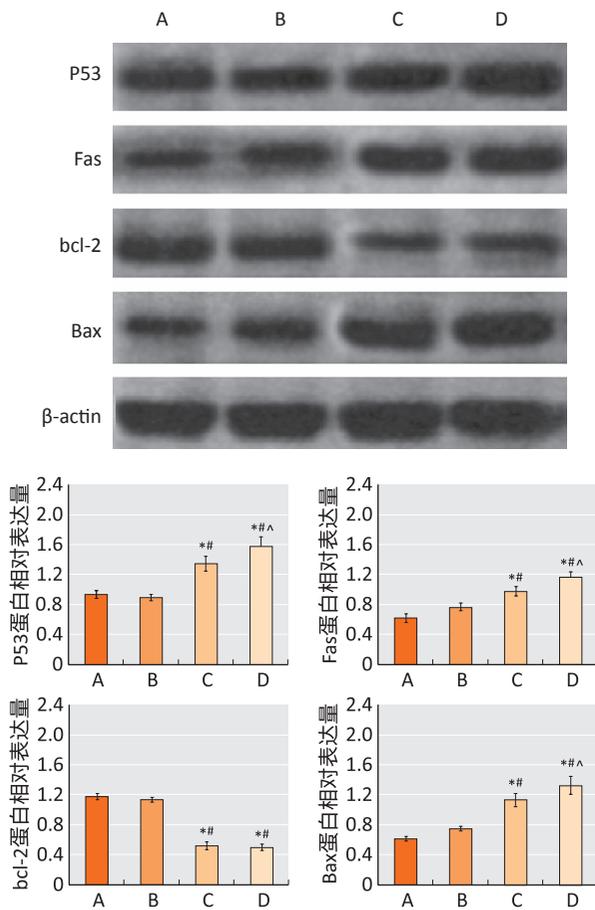
表 4 各组大鼠血清抗氧化指标比较 ($n=15$, $\mu\text{mol/L}$)

组别	SOD	GSH	T-AOC	MDA
普通组	0.92±0.14	2.47±0.26	8.54±1.23	5.04±0.43
低铅组	0.88±0.12	2.38±0.21	7.98±1.02	5.25±0.87
高脂组	0.54±0.09**	1.89±0.20**	4.32±1.65**	7.78±1.04**
低铅高脂组	0.41±0.08**^	1.12±0.12**^	3.25±1.37**^	9.03±1.52**^
F	12.167	16.784	21.652	18.805
P	0.000	0.000	0.000	0.000

[注] *: 与普通组相比, $P<0.05$; #: 与低铅组相比, $P<0.05$; ^: 与高脂组相比, $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠肝脏中P53、Fas、bcl-2和Bax蛋白表达

蛋白表达如图2所示。P53、Fas和Bax表达,普通组和低铅组大鼠没有差异;而高脂组和低铅高脂组则明显高于普通组和低铅组($P<0.05$);此外,低铅高脂组又明显高于高脂组($P<0.05$)。bcl-2表达,普通组和低铅组大鼠没有差异;而高脂组和低铅高脂组则明显低于普通组和低铅组($P<0.05$);但低铅高脂组和高脂组没有差异。

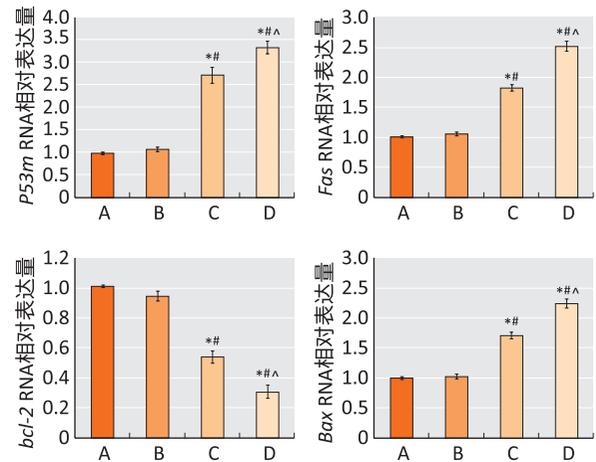


[注] A: 普通组; B: 低铅组; C: 高脂组; D: 低铅高脂组。*: 与普通组相比, $P<0.05$; #: 与低铅组相比, $P<0.05$; ^: 与高脂组相比, $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠肝脏组织中P53、Fas、bcl-2和Bax蛋白表达结果

2.7 大鼠肝脏中P53、Fas、bcl-2和Bax mRNA表达

mRNA表达结果与蛋白表达结果基本一致。P53、Fas和Bax mRNA表达,普通组和低铅组大鼠没有差异;而高脂组和低铅高脂组则明显高于普通组和低铅组($P<0.05$);此外,低铅高脂组又明显高于高脂组($P<0.05$)。bcl-2 mRNA表达,普通组和低铅组没有差异;而高脂组和低铅高脂组则明显低于普通组和低铅组($P<0.05$);此外,低铅高脂组又明显低于高脂组($P<0.05$)。见图3。



[注] A: 普通组; B: 低铅组; C: 高脂组; D: 低铅高脂组。*: 与普通组相比, $P<0.05$; #: 与低铅组相比, $P<0.05$; ^: 与高脂组相比, $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠肝脏组织中P53、Fas、bcl-2和Bax mRNA表达结果

3 讨论

许多研究均证实,肝脏是铅中毒损害的主要靶向器官之一,长期铅摄入可以引起多种肝脏疾病的发生^[6-8],但是上述多项研究均基于实验室研究结果。正如前言中所述,因为人体对铅有一定的清除能力,所以低剂量的铅一般不会损害肝脏。而当肝脏在受到损害时,低铅摄入则可能起到加速损害肝脏的作用。损害的机理则与铅中毒带来的氧化损伤密切相关。肝脏中存在着许多含不配对电子的氧衍生物ROS,ROS可以提高肝脏的抗氧化活性,而在肝脏发生损害后,可出现ROS活性降低,主要表现为GSH、SOD和T-AOC活性的下降,以及有害物质MDA的升高,从而影响肝脏细胞的正常功能^[9-10]。有研究也在慢性铅中毒的动物肝脏内观察到了GSH活性的降低,但是其构建的慢性低铅中毒铅含量依然较高^[11]。基于此,本研究只给予大鼠万分之三的含铅饲料喂养,这与人体在自然界铅暴露水平是一致的。本研究结果发现,相较于普通饲料喂养,低铅组大鼠抗氧化活性指标SOD、GSH、T-AOC和MDA并没有明显变化,这与前述推测是基本一致的,即体内对低剂量的铅有一定的排除能力,一般不会带来损害;相较于普通组和低铅组,高脂组和低铅高脂组SOD、GSH、T-AOC明显降低,MDA明显升高;而相较于高脂组,低铅高脂组大鼠抗氧化能力进一步降低。这提示,在大鼠肝脏受到损害后低铅会进一步损害肝脏。

除了细胞氧化应激的作用,低铅加重非酒精性脂肪肝病的肝脏负担还与哪些因素有关?基于文献总

结^[12-14]，我们推测，在肝细胞受到脂肪颗粒浸润后，低铅对肝细胞凋亡有一定的促进作用。细胞凋亡与 bcl-2 家族蛋白、P53 和 Fas 三者密切相关^[15]。首先为 bcl-2 家族，bcl-2 家族蛋白中起关键核心作用的主要为 bcl-2 和 Bax 二个蛋白，二者构成了一对正负凋亡调节基因，bcl-2 基因主要作用是抑制细胞凋亡，提高细胞存活能力，而 Bax 基因则主要是促进细胞凋亡的发生^[16]。其次为 P53 基因，P53 基因是肿瘤发生过程中最为广泛的基因，其可以与 bcl-2 结合，抑制 bcl-2 的活性，促进 Bax 表达，进一步诱发细胞凋亡^[17]，此外 P53 也可以调节 Fas 的表达^[18]。Fas 是肿瘤坏死受体家族蛋白，其主要表达于细胞表面，而 Fas 信号的激活可以直接诱导细胞凋亡的发生^[19-20]。基于本实验设计发现，P53、Fas、bcl-2 和 Bax 的蛋白和 mRNA 表达特点与抗氧化相关指标的表达有着相似性，在普通组和低铅组大鼠肝脏，上述 4 个蛋白的表达并没有明显差异，而高脂组和低铅高脂组 P53、Fas 和 Bax 明显高于普通组和低铅组 ($P < 0.05$)，bcl-2 则明显低于普通组和低铅组 ($P < 0.05$)，此外，低铅高脂组，P53、Fas 和 Bax 明显高于高脂组和低铅组 ($P < 0.05$)，bcl-2 则明显低于高脂组 ($P < 0.05$)。这提示低铅在肝脏受到损害后可以加速肝细胞凋亡的发生。

结合肝脏病理学和肝功能的变化特点，本研究提示：低铅可通过加速细胞凋亡，同时降低抗氧化能力，进而损害肝功能，给非酒精性脂肪肝大鼠带来损伤。

参考文献

- [1] 何剪太, 朱轩仪, 巫放明, 等. 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] 王磊, 陈酌, 魏兴武. 石河子地区 1978 例 0~6 岁儿童血铅水平调查分析 [J]. 农垦医学, 2016, 38 (5) : 465-467.
- [3] 邱炜, 陈莹, 胡秀, 等. 云南某地区儿童及青少年铅中毒现状及影响因素分析 [J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37 (11) : 18-22.
- [4] 吴晨. 铅对小鼠肝、肾、脑毒性效应的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [5] 陶冬青, 胡必成, 先华, 等. 醋酸铅致大鼠肾小管上皮细胞凋亡及中药干预作用 [J]. 内蒙古中医药, 2013, 32 (15) : 116-117.
- [6] 黄福林. 慢性铅中毒与肝功能损害的临床分析 [J]. 中国医药指南, 2018, 16 (7) : 133-134.
- [7] 尚波, 傅恩惠. 铅中毒致肝脏损害 9 例临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2002, 15 (1) : 23-24.
- [8] ROSNER D. A lead poisoning crisis enters its second century [J]. Health Aff, 2016, 35 (5) : 756-759.
- [9] 蒋兴亮, 张均, 刘素兰, 等. 非酒精性脂肪肝患者氧化应激和抗氧化酶状态 [J]. 四川医学, 2009, 30 (12) : 1958-1960.
- [10] ZHONG B, CHEN J, SHAFI M, et al. Effect of lead (Pb) on antioxidation system and accumulation ability of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2017, 138 : 71-77.
- [11] 王浩. 铅中毒导致的鸡肝脏毒性及硒的缓解作用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [12] 彭梦洁. 沉默 COX-2 对非酒精性脂肪肝细胞凋亡及神经酰胺水平的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- [13] 赵立强, 伏代刚, 赵元全, 等. 14 例铅中毒患者肝脏损害临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (1) : 20-21.
- [14] 吴方, 余陈欢, 张欢欢, 等. 线粒体-细胞色素 c 途径在兔非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26 (4) : 7-13, 23.
- [15] 李柳梅. 脂肪方对非酒精性脂肪肝 NF- κ B-TNF- α /Bcl-2 通路的调节效应 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
- [16] 康敏, 李森, 钟德君, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞凋亡与线粒体膜通透性转换孔开放的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33 (7) : 1062-1066.
- [17] 黎国文. COX-2 抑制剂对脂变肝细胞细胞衰老及 p53、p21 基因表达的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- [18] O'CONNOR L, STRASSER A. Fas, p53, and apoptosis [J]. Science, 1999, 284 (5419) : 1431.
- [19] 陈乃玲, 白玲, 邓涛, 等. 慢性肝病肝细胞凋亡 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-2 α 等蛋白表达 [J]. 中华传染病杂志, 2003, 21 (2) : 122-124.
- [20] 南月敏, 乔梁, 于君, 等. Fas 及其配体诱导非酒精性脂肪性肝炎肝细胞凋亡 [J]. 中华消化杂志, 2006, 26 (12) : 841-842.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈非儿, 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)