

# 硫酸铜染毒对小鼠海马神经细胞突触可塑性相关蛋白表达的影响

杜莹, 张亚茹, 张虎, 赵超, 张颖, 刘冉, 浦跃朴, 尹立红

东南大学公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19772

## 摘要:

**[背景]** 铜稳态失衡与多种神经退行性疾病密切相关, 而铜暴露对学习记忆损害作用的具体机制尚不明确。突触可塑性是学习记忆的细胞生物学基础, 突触可塑性相关蛋白可反映突触生长、发育、连接的过程。

**[目的]** 探讨硫酸铜染毒对小鼠海马神经元 (HT22 细胞) 突触可塑性相关蛋白表达的影响, 为研究铜暴露对学习记忆的作用机制提供科学依据。

**[方法]** 以 HT22 细胞为靶细胞, 同时设立 CuSO<sub>4</sub> 染毒组 (CuSO<sub>4</sub> 浓度分别为 10、20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup>) 和对照组 (予以同等体积完全培养基处理)。采用 CCK-8 法检测染毒 24、36、48 h 后 HT22 细胞增殖活性。染毒 48 h 后, 采用 Western blotting 法检测突触可塑性相关蛋白突触泡膜素 (SYP)、突触后致密蛋白-95 (PSD-95)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 及酪氨酸激酶 B (TrkB) 的蛋白表达水平。

**[结果]** 染毒 24、36、48 h 后, 各组间细胞增殖活性的差异均有统计学意义 ( $F=27.99、13.80、29.15$ , 均  $P<0.01$ )。染毒 48 h 后, 10、20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> 硫酸铜组 HT22 细胞增殖活性分别为对照组的 89.26%、88.72%、81.50%、67.42%, 均  $P<0.05$ 。染毒 48 h 后, 与对照组相比, 20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> 染毒组 HT22 细胞 SYP 蛋白相对表达量分别下调 15.93%、29.55%、42.69% (均  $P<0.05$ ); 40、80 μmol·L<sup>-1</sup> 染毒组 HT22 细胞 PSD-95 蛋白相对表达量分别下调 41.24%、47.19% (均  $P<0.05$ ); 20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> 染毒组 BDNF 蛋白相对表达量分别下调 23.17%、24.49%、58.99% (均  $P<0.05$ ); 各组间 HT22 细胞 TrkB 蛋白相对表达量差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 与对照组相比, 80 μmol·L<sup>-1</sup> 染毒组 TrkB 蛋白相对表达量下调 38.03% ( $P<0.05$ )。

**[结论]** 硫酸铜染毒可降低海马神经细胞增殖活性, 可能与突触可塑性相关蛋白的表达下调有关。

**关键词:** 硫酸铜; 神经毒性; 突触可塑性; 海马神经细胞

**Effects of copper sulfate on expressions of synaptic plasticity-related proteins in mice hippocampal nerve cells** DU Ying, ZHANG Ya-ru, ZHANG Hu, ZHAO Chao, ZHANG Ying, LIU Ran, PU Yue-pu, YIN Li-hong (Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

## Abstract:

**[Background]** The imbalance of copper homeostasis is closely related to a variety of neurodegenerative diseases, but the specific mechanism of copper-induced learning and memory impairment is still unclear. Synaptic plasticity is the cell biological basis of learning and memory, and synaptic plasticity proteins reflect the processes of synaptic growth, development, and connectivity.

**[Objective]** This *in vitro* experiment is designed to investigate the effects of copper sulfate exposure on the expressions of synaptic plasticity-related proteins of hippocampal neurons (HT22 cells), and provide a scientific basis for studying the mechanism of copper-induced learning and memory impairment.

**[Methods]** HT22 cells were divided into one control group (equal volume of complete medium) and four CuSO<sub>4</sub> exposure groups (CuSO<sub>4</sub> concentrations were 10, 20, 40, and 80 μmol·L<sup>-1</sup>, respectively). The proliferation activity of HT22 cells was detected by CCK-8 method after CuSO<sub>4</sub> exposure for 24, 36, and 48 h. The expressions of synaptic plasticity related proteins including synaptophysin

## 基金项目

国家自然科学基金项目 (81273123)

## 作者简介

杜莹 (1993—), 女, 硕士生;  
E-mail: 2549924643@qq.com

## 通信作者

尹立红, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

## 利益冲突

无申报

收稿日期 2019-11-12

录用日期 2020-01-11

文章编号 2095-9982(2020)03-0249-05

中图分类号 R114

文献标志码 A

## 引用

杜莹, 张亚茹, 张虎, 等. 硫酸铜染毒对小鼠海马神经细胞突触可塑性相关蛋白表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (3): 249-253.

## 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19772

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

YIN Li-hong, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

## Competing interests

None declared

Received 2019-11-12

Accepted 2020-01-11

## To cite

DU Ying, ZHANG Ya-ru, ZHANG Hu, et al. Effects of copper sulfate on expressions of synaptic plasticity-related proteins in mice hippocampal nerve cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 249-253.

## Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19772

(SYP), post-synaptic dense protein-95 (PSD-95), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and tyrosine kinase B (TrkB) were detected by Western blotting after CuSO<sub>4</sub> exposure for 48 h.

**[Results]** After 24, 36, and 48 h of designed treatment, the cell proliferation activities among groups were statistically different ( $F=27.99$ , 13.80, and 29.15, all  $P<0.01$ ); after 48 h of treatment, the proliferation activities of HT22 cells in the 10, 20, 40, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub> groups were 89.26%, 88.72%, 81.50%, and 67.42%, respectively, and were lower than that in the control group (all  $P<0.05$ ). After 48 h of treatment, compared with the control group, the SYP relative protein expression levels of HT22 cells in the 20, 40, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub> groups were down-regulated by 15.93%, 29.55%, and 42.69%, respectively (all  $P<0.05$ ); the PSD-95 relative protein expression levels in the 40 and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub> groups were down-regulated by 41.24% and 47.19%, respectively (both  $P<0.05$ ); the BDNF relative protein expression levels in the 20, 40, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub> groups were down-regulated by 23.17%, 24.49%, and 58.99%, respectively (all  $P<0.05$ ); there was a statistically significant difference in TrkB relative protein expression levels among the groups ( $P<0.05$ ), and the TrkB relative protein expression level of HT22 cells in the 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub> group was down-regulated by 38.03% compared with the control group ( $P<0.05$ ).

**[Conclusion]** The exposure to copper sulfate decreases the proliferation activity of hippocampal nerve cells, which may be related to the down-regulation of synaptic plasticity-related proteins.

**Keywords:** copper sulfate; neurotoxicity; synaptic plasticity; hippocampal nerve cell

铜是人体必需的微量元素,但是过多摄入会导致体内铜稳态失衡,并通过血脑屏障进入海马、基底核、小脑和突触膜等区域,产生神经毒性作用。研究证明,铜稳态失衡如血清游离铜的升高、铜蓝结合蛋白的减少与阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病等多种神经退行性疾病密切相关<sup>[1-3]</sup>。动物研究结果显示,铜可诱导海马和额叶皮质细胞凋亡和星形细胞增多,并加重小鼠空间学习记忆障碍<sup>[4-5]</sup>。因此,环境铜暴露的健康危害引起了广泛重视。

近年来,国内外对铜毒性的研究主要集中在铜暴露引起的肝脏和神经系统损害表现,而缺乏相关机制研究。突触可塑性是在外环境作用下,神经系统为维持其相对稳定发生的适应性变化,是学习记忆的细胞生物学基础<sup>[6-7]</sup>。海马是学习记忆尤其是空间认知功能相关的脑区,但铜染毒对海马细胞突触的损害作用及机制研究尚缺少系统的研究报道。由此,本研究以小鼠海马神经元为靶细胞,探讨硫酸铜致神经毒性的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试细胞

小鼠海马神经元 (HT22 细胞) 由第四军医大学唐都医院神经外科惠赠。

### 1.2 主要试剂和仪器

DMEM 高糖培养基 (Hyclone, 美国), 胎牛血清 (BI, 以色列), 五水合硫酸铜 (国药集团化学试剂公司, 中国), CCK-8 检测试剂盒 (七海复泰公司, 中国), 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国), RIPA 裂解液 (碧云天生物技术公司,

中国), 双色预染蛋白 Marker (上海雅酶, 中国), 突触泡膜素 (synaptophysin, SYP)、突触后致密蛋白-95 (post-synaptic density-95, PSD-95)、脑源性神经生长因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (Proteintech, 美国), 酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) 抗体、 $\alpha$ -微管蛋白 ( $\alpha$ -tubulin) 抗体、 $\beta$ -actin 抗体及抗小鼠、抗兔 IgG 二抗 (爱博泰克生物公司, 中国), 流式细胞仪 (BD, 美国), 倒置显微镜 (ZEISS, 德国)。

### 1.3 细胞培养及处理

**1.3.1 细胞培养** HT22 细胞用 DMEM 高糖培养基 (10% 胎牛血清、 $1\times 10^5$  U $\cdot\text{L}^{-1}$  青霉素、100 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  链霉素) 培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下的培养箱中, 待细胞生长至对数生长期时, 收集备用。

**1.3.2 染毒方法与分组** 将五水合硫酸铜 (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 加入适量完全培养基, 完全溶解后配制成 12 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  的储存液, 染毒剂量参照国内外生活饮用水标准。WHO《饮用水质量指南》规定铜的指导值为 2.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  (约 31.50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[8]</sup>, 我国 GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定为 1.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  (约 15.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[9]</sup>, 因此本研究设立 10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸铜染毒组, 每组设 3 个平行, 同时设立对照组。

### 1.4 细胞增殖活性检测

采用 CCK-8 法测定 HT22 细胞的增殖活性。在 96 孔培养板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 使每孔细胞数达到  $8\times 10^3$  个, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 条件培养, 细胞贴壁后, 换液后加入 CuSO<sub>4</sub> 工作液, 分别使其终浓度为 0、10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。孵育 24、36、48 h 后, 更换新鲜培养基并向每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 将培养板在培养

箱内避光孵育 1 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值 ( $D$ ), 计算细胞增殖活性。细胞增殖活性 (%) =  $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

### 1.5 Western blotting 法检测 SYP、PSD-95、BDNF 及 TrkB 蛋白表达水平

硫酸铜染毒 48 h 后, 用细胞刮板刮下各组细胞, 分别添加 RIPA 裂解液-丝氨酸蛋白酶抑制剂-磷酸蛋白酶抑制剂混合液 (体积比为 100 : 1 : 1), 研磨 2 min, 冰上放置 30 min 使细胞充分裂解。离心后取上清液, BCA 法测定总蛋白浓度, 并配成  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  十二烷基硫酸钠混合液,  $100^\circ\text{C}$  煮沸变性, 于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。总蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳仪电压设置为浓缩胶 70 V, 30 min; 分离胶 90 V, 60 min; 转膜条件为 250 mA、2.5 h, 转移至聚偏氟乙烯膜后, 用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 将目的蛋白和内参蛋白稀释适当倍数后,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。由于  $\beta$ -actin 与 SYP 分子量接近, 较难区分, 故同时用  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -actin 作为内参蛋白。在摇床上用 TBST 洗 3 次后加入相对应的二抗, 室温孵育 2 h。最后用 TBST 洗膜 3 次, 利用化学发光试剂检测并拍照, 通过 Image J 软件对蛋白条带进行灰度定量分析。

### 1.6 统计学分析

使用 SPSS 19.0 和 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析及作图。各处理组间比较用 One-way ANOVA 方差分析, 再进行 Turkey 两两比较。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

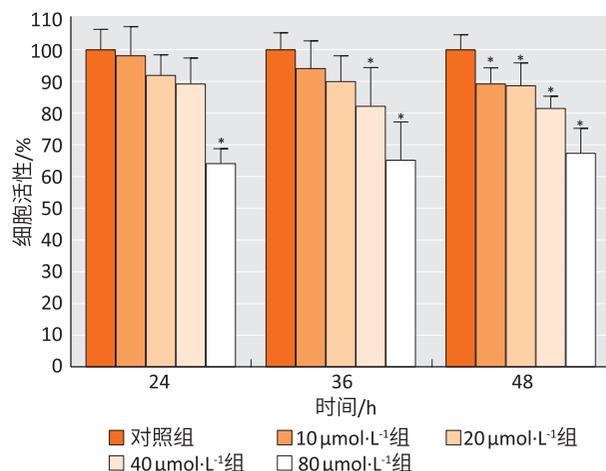
### 2.1 细胞活性

CCK-8 实验结果显示, 染毒 24、36、48 h 后, 各组间细胞活性的差异均有统计学意义 ( $F=27.99$ 、 $13.80$ 、 $29.15$ , 均  $P<0.01$ )。染毒 48 h 后,  $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸铜组 HT22 细胞增殖活性分别为  $89.26\%$ 、 $88.72\%$ 、 $81.50\%$ 、 $67.42\%$ , 染毒组细胞增殖活性均低于对照组 (均  $P<0.05$ )。见图 1。

### 2.2 HT22 细胞 SYP、PSD-95 蛋白表达

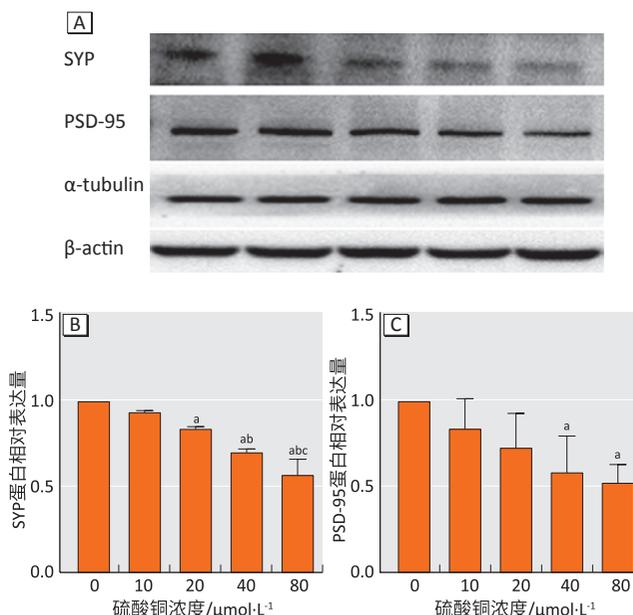
Western blotting 检测结果显示, 各组间 HT22 细胞 SYP、PSD-95 表达有统计学差异 ( $F=42.23$ 、 $6.02$ , 均  $P<0.01$ )。与对照组相比,  $20$ 、 $40$ 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸铜处理 HT22 细胞 48 h 后, SYP 蛋白相对表达量依次下调  $15.93\%$ 、 $29.55\%$ 、 $42.69\%$ , 差异有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) ;  $40$ 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸铜处理 HT22 细胞 48 h 后, PSD-95 蛋白相对表达量依次下调  $41.24\%$ 、 $47.19\%$ , 差

异有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。见图 2。



[注] \* : 与对照组比较,  $P<0.05$ 。

图 1 硫酸铜染毒后 HT22 细胞活性

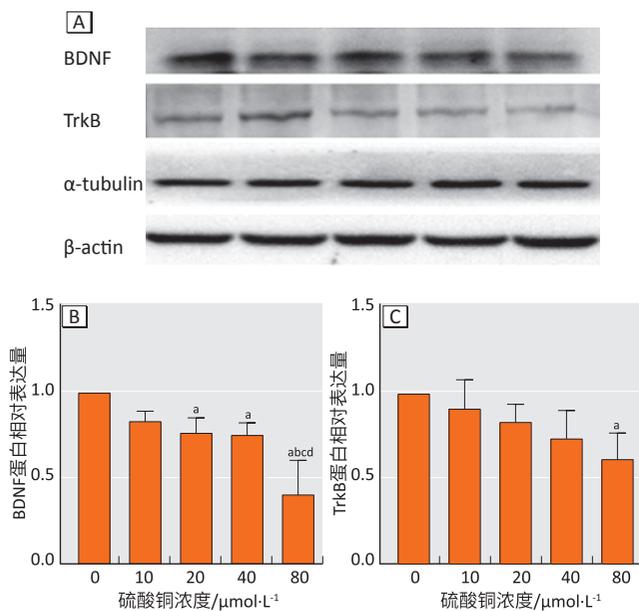


[注] A : Western blotting 电泳图 ; B : SYP 蛋白 ; C : PSD-95 蛋白。a : 与对照组相比,  $P<0.05$  ; b : 与  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒组相比,  $P<0.05$  ; c : 与  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒组相比,  $P<0.05$ 。

图 2 硫酸铜染毒 48 h 后 HT22 细胞 SYP、PSD-95 蛋白表达水平

### 2.3 HT22 细胞 BDNF、TrkB 蛋白表达

Western blotting 检测结果显示, 各组间 HT22 细胞 BDNF、TrkB 表达均有统计学差异 ( $F=18.12$ 、 $4.162$ , 均  $P<0.05$ )。与对照组相比,  $20$ 、 $40$ 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸铜处理 HT22 细胞 48 h 后 BDNF 蛋白相对表达量依次下调  $23.17\%$ 、 $24.49\%$ 、 $58.99\%$ , 差异有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) ; 各组间 HT22 细胞 TrkB 蛋白相对表达量差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) , 与对照组相比,  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒组 TrkB 蛋白相对表达量下调  $38.03\%$  ( $P<0.05$ )。见图 3。



[注] A: Western blotting 电泳图; B: BDNF 蛋白; C: TrkB 蛋白。a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组相比,  $P < 0.05$ ; c: 与  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组相比,  $P < 0.05$ ; d: 与  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组相比,  $P < 0.05$ 。

图3 硫酸铜染毒48h后HT22细胞BDNF、TrkB蛋白表达水平

### 3 讨论

随着铜矿的开采冶炼以及其在农药、饮用水管材等领域的应用,我国部分地区环境中铜含量已超过限值。据报道,1994—2001年我国城市污泥中铜平均值为  $486 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,铜超标率为12%,是仅次于锌的第二污染物<sup>[10]</sup>;2011年淮河水铜含量是我国《生活饮用水卫生标准》铜限值的1.6倍<sup>[11]</sup>。环境铜暴露的健康风险不容忽视。

铜被血液吸收后,穿过血脑屏障进入海马、基底核等<sup>[12]</sup>,使大脑表现出明显的组织病理学损伤,损害动物学习记忆能力。王艳昕<sup>[13]</sup>研究表明,铜染毒Wister大鼠90d后海马区细胞数量减少,体积缩小,胞浆浓缩,呈现凋亡特征性改变,伴随动物空间认知和记忆能力受损<sup>[14]</sup>,但铜染毒对学习记忆损伤的具体机制尚不明确。海马是哺乳动物体内与学习记忆的关系最密切的结构之一,直接参与信息的贮存和回忆,内部神经元的损伤是学习记忆退化的主要原因。突触可塑性表现为突触形态和功能的适应性改变,主要包括长时程增强(long-term potentiation, LTP)和长时程抑制(long-term depression, LTD),二者的协调表达是学习记忆形成的神经生理学基础<sup>[15]</sup>。因此,以铜对海马神经元突触可塑性的作用为研究切入点,将为脑铜代谢和铜致神经系统疾病的影响,特别是为铜对学习记忆影响的机制探讨提供科学依据。

海马区域突触功能的实现对大脑学习记忆尤为重要,突触前和突触后受到干扰均可造成中枢神经系统突触传递和突触可塑性的异常改变。SYP是一种突触前囊泡膜蛋白,与神经生长、修复再生、突触结构和功能可塑性调节有关,是突触前特异的标志性蛋白,SYP的密度、分布间接反映突触的数量和分布情况<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,铜暴露可降低HT22细胞SYP的表达,提示铜可通过调节SYP从而减弱突触囊泡转运能力,使神经系统的信息传递、加工和储存出现障碍。PSD是突触后膜内侧胞质面的一层均质性致密物质,是LTP发生的结构基础。PSD-95是PSD中含量最丰富的蛋白之一,位于谷氨酸能神经的突触后致密区,在突触后信号转导系统的转配和组织起核心作用,常作为突触后反映突触效能的特异性标志物。PSD-95参与突触的形成、调控海马神经元LTP,轻度认知功能损伤大鼠海马PSD-95水平明显降低<sup>[17]</sup>。本研究中,铜暴露使HT22细胞PSD-95表达水平减少,提示铜暴露后HT22细胞突触后致密物质变薄或突触活性降低,导致突触的传导发生障碍。此外,SYP、PSD-95作为突触前、突触后的标志性蛋白,在突触可塑性方面有重要作用,同时也与神经系统疾病有一定关系。研究表明,SYP参与 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖神经递质的释放,PSD-95促进谷氨酸受体的丛集和活性,两者均会影响神经系统传导功能,在老年痴呆、精神分裂症等神经系统疾病的发病中起重要作用<sup>[18]</sup>。

BDNF属于神经营养素家族,不仅在神经系统抵抗伤害性刺激、促使神经元损伤后的再生方面发挥重要作用,而且参与突触可塑性的形成和细胞间的信号传导过程。TrkB是BDNF的特异性受体,由酪氨酸激酶原癌基因编码,BDNF必须与TrkB结合才能发挥其生物学作用<sup>[18-21]</sup>。当BDNF与细胞膜上的受体TrkB结合,细胞内信号传导通路被激活,调节神经系统钙离子浓度,该过程对神经的生长和发育、提高神经元的存活率有重要的支持作用;同时,BDNF与TrkB的结合可调节谷氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸突触后神经递质受体的数量和分布,最终影响突触可塑性和学习记忆活动<sup>[22]</sup>。因此,BDNF及TrkB缺乏或功能异常可伴有严重的学习记忆功能障碍。本研究结果显示,铜染毒组HT22细胞BDNF、TrkB受体表达下调,说明铜可能通过BDNF/TrkB影响下游通路,调节突触活动和兴奋性,最终影响突触可塑性。

综上所述,硫酸铜染毒可明显降低小鼠海马神经

元细胞增殖活性,可能与突触可塑性相关蛋白表达下调有关。本课题组将在此基础上,结合污染区域铜负荷人群研究成果,开展体内和体外实验进行验证,深入探讨铜暴露致学习记忆损害的机制,为铜暴露健康风险评估和环境限量标准的完善提供科学依据。

### 参考文献

- [1] SQUITTI R, GHIDONI R, SIOTTO M, et al. Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75 (4) : 574-580.
- [2] BULCKE F, DRINGEN R, SCHEIBER IF. Neurotoxicity of copper [M] // ASCHNER M, COSTA L G. Neurotoxicity of Metals. Cham : Springer, 2017 : 313-343.
- [3] GAIER E D, EIPPER B A, MAINS R E. Copper signaling in the mammalian nervous system : synaptic effects [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91 (1) : 2-19.
- [4] KALITA J, KUMAR V, MISRA U K, et al. Memory and learning dysfunction following copper toxicity : biochemical and immunohistochemical basis [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (5) : 3800-3811.
- [5] BEHZADFAR L, ABDOLLAHI M, SABZEVARI O, et al. Potentiating role of copper on spatial memory deficit induced by beta amyloid and evaluation of mitochondrial function markers in the hippocampus of rats [J]. *Metallomics*, 2017, 9 (7) : 969-980.
- [6] SINGH A, ABRAHAM W C. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease [J]. *Exp Brain Res*, 2017, 235 (6) : 1645-1655.
- [7] VOSE L R, STANTON P K. Synaptic plasticity, metaplasticity and depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15 (1) : 71-86.
- [8] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality [M]. 4th ed. Geneva : World Health Organization, 2017.
- [9] 生活饮用水卫生标准 : GB 5749—2006 [S]. 北京 : 中国标准出版社, 2007.
- [10] 陈同斌, 黄启飞, 高定, 等. 中国城市污泥的重金属含量及其变化趋势 [J]. *环境科学学报*, 2003, 23 (5) : 561-569.
- [11] 严睿文, 李玉成. 淮河安徽段水及沉积物中重金属的研究 [J]. *生物学杂志*, 2010, 27 (2) : 74-75, 79.
- [12] CRUCES-SANDE A, RODRÍGUEZ-PÉREZ A I, HERBELLO-HERMELO P, et al. Copper increases brain oxidative stress and enhances the ability of 6-Hydroxydopamine to cause dopaminergic degeneration in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56 (4) : 2845-2854.
- [13] 王艳昕. 基于 Notch 信号通路解毒法干预铜负荷大鼠的认知障碍及海马细胞凋亡的实验研究 [D]. 武汉 : 湖北中医药大学, 2015.
- [14] EL-HAK H N, MOBARAK Y M. The neurotoxic impact of subchronic exposure of male rats to copper oxochloride [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 52 : 186-191.
- [15] 郭敏, 李刚. 突触可塑性相关蛋白的研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2013, 3 (6) : 57-64.
- [16] ZHU X, WANG P, LIU H, et al. Changes and significance of SYP and GAP-43 expression in the hippocampus of CIH rats [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16 (3) : 394-402.
- [17] WANG D, LI B, WU Y, et al. The effects of maternal atrazine exposure and swimming training on spatial learning memory and hippocampal morphology in offspring male rats via PSD95/NR2B signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39 (7) : 1003-1015.
- [18] 柴继侠, 王元元, 李微微, 等. 突触后致密蛋白 95 (PSD95) 和突触小泡蛋白在神经元成熟过程中的分布 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32 (12) : 1619-1622.
- [19] GREENBERG M E, XU B, LU B, et al. New insights in the biology of BDNF synthesis and release : implications in CNS function [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (41) : 12764-12767.
- [20] LEBMANN V, BRIGADSKI T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion : an update [J]. *Neurosci Res*, 2009, 65 (1) : 11-22.
- [21] LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76 : 639-656.
- [22] 邢云朋, 贾茹, 牛侨, 等. BDNF-TrkB 通路在苯并[a]芘致大鼠学习记忆损伤中作用研究 [J]. *中国职业医学*, 2016, 43 (2) : 127-131.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 陈姣 ; 校对 : 汪源)