

镉与微塑料单独及联合暴露对小鼠认知功能的影响

张洪嘉¹,姚文环²,寇蕊蕊³,程东²,张天亮²,赵秀兰¹

(1.山东大学公共卫生学院卫生毒理学系,山东 济南 250012;

2.山东省疾病预防控制中心,山东 济南 250013;3.山东大学公共卫生学院实验教学中心,山东 济南 250012)

摘要:目的 探讨镉(cadmium, Cd)、微塑料(microplastics, MPs)单独或联合暴露对认知功能损伤的发生机制。方法 按照体质量随机数字法将雌性小鼠分为空白对照组、Cd组(Cd:5 mg/kg·bw CdCl₂)、MPs组(MPs:10 mg/kg·bw)、Cd+MPs联合组(Cd+MPs:5 mg/kg·bw CdCl₂+10 mg/kg·bw MPs),每组14只。每天分别经灌胃给予小鼠CdCl₂和MPs。12周末,采用神经行为学方法评价小鼠认知功能。实验结束后,每组随机取4只小鼠经体内灌注固定后,取大脑进行大脑神经元核抗原(neuronal nuclei antigen, NeuN)免疫组化检测;每组随机另取5只小鼠经尾静脉注射伊文思蓝检测血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性;每组其余动物处死后取大脑组织采用Western blotting进行相关蛋白分子表达检测;采用石墨炉原子吸收分光光度计分析小鼠大脑Cd含量。结果 旷场试验结果显示,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组小鼠在周围区域停留时间均高于对照组($P<0.05$),在中央区活动时间均低于对照组($P<0.05$)。新物体识别实验结果显示,与对照组相比,Cd组、MPs组、Cd+MPs联合组小鼠识别指数均表现为明显降低($P<0.05$)。伊文思蓝检测结果显示,与对照组相比,Cd组、MPs组以及Cd+MPs联合组小鼠大脑匀浆OD值明显升高($P<0.05$),提示BBB通透性增加。大脑组织Cd含量分析结果显示,与对照组相比,Cd组、Cd+MPs联合组小鼠大脑Cd含量明显增加($P<0.05$),而且Cd+MPs联合组小鼠大脑Cd含量明显高于Cd组($P<0.05$)。NeuN免疫组化染色后神经元计数结果显示,与对照组相比,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组大脑皮层神经元数目降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Western blotting结果显示,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组小鼠大脑皮层突触素1、突触素、突触后密度蛋白95蛋白表达均降低($P<0.05$),其中Cd+MPs联合组降低幅度最大。与对照组相比,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组小鼠大脑皮层炎症关键调控蛋白NF- κ B激活,表现为p-NF- κ B/总NF- κ B比值明显升高($P<0.05$)。同时,焦亡轴下游消皮素D与NeuN免疫荧光双染显示,Cd组、MPs组以及Cd+MPs联合组小鼠大脑均观察到消皮素D与神经元共定位,以Cd+MPs联合组焦亡神经元最多。结论 Cd和MPs单独暴露均导致小鼠认知功能损伤,两者联合暴露大脑损伤加重,NF- κ B激活,神经元炎症焦亡可能是Cd和MPs共同的作用机制之一。

关键词:镉;微塑料;认知功能;神经元;细胞焦亡

中图分类号:R114 文献标志码:A

Effect of alone and combined exposure to cadmium and microplastics on cognitive function in mice

ZHANG Hongjia¹, YAO Wenhuan², KOU Ruirui³, CHENG Dong², ZHANG Tianliang², ZHAO Xiulan¹

(1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250013, Shandong, China;

3. Experimental Teaching Center, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of cognitive impairment caused by cadmium (Cd) and microplastics (MPs) exposure alone or in combination. **Methods** Female mice were divided into control group, Cd group (Cd: 5 mg/kg·bw CdCl₂), MPs group (MPs: 10 mg/kg·bw), Cd+MPs combination group (Cd+MPs: 5 mg/kg·bw CdCl₂+ 10 mg/kg·bw MPs) by random number method according to body weight, with 14 mice in each group. The mice were

given CdCl₂ and MPs once daily by gavage. At the end of 12 weeks, the neurobehavioral performances of the mice were evaluated. Subsequently, 4 mice from each group were randomly selected and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA), and the brains were dissected for immunohistochemical staining with NeuN. Another 5 mice from each group were treated with Evans blue by tail vein injection to determine the blood-brain barrier (BBB) permeability. The remaining mice of each group were sacrificed and the brains were subjected to Western blotting for detection of protein expression of interest. The Cd content in the brain of the mice was analysed by graphite furnace atomic absorption spectrophotometer. **Results** The results of the open field test showed that the dwell times in the peripheral area of mice from the Cd group, MPs group and Cd+MPs combination group were higher than those of the control group ($P<0.05$), and the activity times in the central region were lower than those of the control group ($P<0.05$). The results of the novel object recognition experiment showed that the recognition index of all mice in the Cd group, MPs group and Cd+MPs combination group was significantly decreased compared with the control mice ($P<0.05$). Evans blue detection showed that the OD values of brain homogenate of mice from the Cd group, MPs group and Cd+MPs combination group significantly increased ($P<0.05$) compared with the control values, indicating the obvious increase of BBB permeability. The results of Cd analysis showed that the Cd content of mouse brain in Cd group and Cd+MPs combination group was significantly increased ($P<0.05$), and the Cd level of mouse brain in Cd+MPs combination group was significantly higher than that of Cd group ($P<0.05$). The neuron count results after NeuN immunohistochemical staining showed that compared with the control group, the decrease of neurons in the brain cortex of mice from Cd group, MPs group and Cd+MPs combination group was statistically significant ($P<0.05$). Western blotting results showed that the protein expressions of synapsin1 (Syn-1), synaptonophysin (SYP) and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the brain cortex of mice from the Cd group, MPs group and Cd+MPs combination group were decreased ($P<0.05$), with the greatest decrease in the Cd+MPs combination group. Compared with the control group, the key inflammatory regulatory protein, NF- κ B, was activated in the brain tissue of Cd, MPs and Cd+MPs combination groups, as evidenced by the p-NF- κ B/total NF- κ B ratio, which was significantly increased ($P<0.05$). Immunofluorescence double staining of the downstream protein of the pyroptosis axis, Gasdermin D (GSDMD), with NeuN showed that co-localization of GSDMD and NeuN-positive neurons was observed in the Cd group, the MPs group and the Cd+MPs combination group, and the most of the neurons with pyroptosis were observed in the Cd+MPs combination group. **Conclusion** Both Cd and MPs individual exposure could lead to cognitive impairment in mice, and their combined exposure aggravated the brain damage. The activation of NF- κ B, inflammatory pyroptosis of neurons in the brain, may be one of the shared mechanisms of Cd and MPs. **Key words**: Cadmium; Microplastics; Cognitive function; Neuron; Pyroptosis

镉 (Cadmium, Cd) 是常见的环境污染物, 水体、大气、土壤中普遍存在, 因其具有难降解、生物蓄积性强等特点, 可沿人类食物链传递发生生物富集^[1]。大气中 Cd 主要来自工业废气、化石燃料燃烧等气体的排放, 水体中 Cd 主要来自采矿、冶炼、塑料制造等行业排放的污水, 土壤中 Cd 主要来自农业生产长期使用的含 Cd 农药、化肥、塑料薄膜, 以及含 Cd 污水灌溉及矿渣污染。职业暴露及吸烟可增加人体 Cd 负荷; 对非吸烟人群而言, 随食物经消化道摄入是机体暴露 Cd 的主要途径^[2]。

塑料是由主要来自石油或天然气的单体聚合物形成的具有可塑性的高分子聚合物, 目前因塑料广泛使用导致的微塑料 (microplastics, MPs) 污染已成为全球关注的环境问题。通常将粒径 5 mm 以下的塑料称为 MPs, 其主要来源包括废弃塑料裂解、轮胎磨损、护理用品等使用^[3]。MPs 广泛存在于大气、水体、土壤等环境介质, 可通过呼吸道吸入、消化道摄入、皮肤接触等途径进入机体^[4]。目前, 食物和饮水

中普遍检出 MPs, 人体多种组织中也报道 MPs 的存在^[5]。MPs 颗粒小、比表面积大, 吸附作用强。

MPs 与 Cd 共存于环境的现象普遍, MPs 与 Cd 联合暴露, 可能会对身体健康产生负面影响。环境 MPs 可吸附 Cd 并作为载体将其转移至生物体内, 并随食物链向高位营养级流动中含量逐渐增加^[6]。有研究报道, Cd 和 MPs 联合暴露可协同引起心血管系统、生殖系统等多种组织损伤^[7]。Cd 和 MPs 均具有神经毒性, 但两者对神经系统的联合健康效应报道较少。本研究将 Cd 单独或与 200 nm 粒径的聚苯乙烯 MPs 联合经口给予小鼠 12 周亚慢性暴露, 观察不同处理对小鼠认知功能的影响, 并结合脑组织中 Cd 含量分析, 初步探讨其病理机制。以期环境污染 Cd 和 MPs 的健康风险评估提供基础数据。

1 材料与方法

本实验经山东大学公共卫生伦理委员会批准 (批件文号: LL20221203)。

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级成年雌性C57BL/6J小鼠购自北京唯尚立德生物科技有限公司[动物许可证号:SCXK(京)2021-0010],实验单位审批通过[许可证号:SYXK(鲁)2020 0022]。

小鼠适应性喂养1周后,按体质量随机分成4个组($n=14$),分别为空白对照组、Cd组(Cd;5 mg/kg·bw CdCl₂)、MPs组(MPs;10 mg/kg·bw MPs)、Cd+MPs联合组(Cd+MPs;5 mg/kg·bw CdCl₂+10 mg/kg·bw MPs)。对山东地区小麦中Cd含量分析显示,Cd最高含量可达410 μg/kg^[8]。有研究显示^[9]小麦对人体Cd暴露的贡献率约占总食物来源的1/10。同时,结合成人小麦的每日消耗量及其他食物来源Cd,纳入实验动物与人体种属和个体差异的不确定系数100,本实验选择了5 mg/kg·bw CdCl₂作为暴露剂量(相当于成人3 mg/kg·bw的Cd)。对MPs进行的风险评估显示成人每周经消化道约摄入0.1~5.0 g的MPs^[10],将该接触量的上限值作为本实验的动物暴露量,即10 mg/kg·bw。按照以上分组,MPs或/和CdCl₂溶液分别经灌胃给予小鼠,1次/d,连续12周,动物自由摄食及饮水。12周末,分别采用新物体识别和旷场试验评价小鼠的认知功能。实验结束,每组随机选取4只小鼠采用4%多聚甲醛进行体内灌注固定,取出大脑继续后固定48 h,脱水后制备冷冻切片进行病理形态学检测。每组另随机取5只动物经尾静脉注射伊文思蓝(evans blue, EB)进行血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性检测。每组其余动物麻醉后处死,剥离大脑、称重,置于液氮速冻后转移至-80℃保存备用。

1.1.2 主要试剂

200 nm聚苯乙烯MPs购自美国Bangs实验室;分析纯CdCl₂购自上海麦克林生化科技有限公司;抗神经元核抗原(neuronal nuclei antigen, NeuN)抗体购自Abcam公司;抗NLR家族Pyrin域蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)抗体、抗突触素1(synapsin1, Syn-1)抗体、抗突触素(synaptonophysin, SYP)抗体、抗突触后密度蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)抗体、抗磷酸化核转录因子κB p65抗原(phospho-nuclear factor κB p65, p-NF-κB p65)、抗核转录因子κB p65抗原(nuclear factor κB p65, NF-κB p65)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;抗消皮素D(Gasdermin D, GSDMD)抗体、抗白细胞介素18(interleukin18, IL-18)抗体购自武汉

三鹰生物科技有限公司;金属加强型3,3-二氨基联苯胺(DAB with Metal Enhancer)购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.1.3 主要仪器设备

原子吸收光谱仪(Thermo Scientific公司,德国);微波消化仪(Milestone公司,意大利);MICROM HM525冰冻切片仪(Thermo Scientific公司,德国);Infinite M200 pro酶标仪(Tecan公司,瑞士);生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司,中国);Pannoramic Scan扫描仪(3dhitech公司,葡萄牙)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠认知功能测定

神经行为学实验前将动物置于测试房间适应环境。

旷场实验中,动物在相对空旷的中央区域活动明显减少通常认为动物出现焦虑样症状。测试开始,将小鼠置于旷场箱中央位置,然后任其自由探索10 min;期间采用smart 3.0小动物行为学记录分析系统记录分析动物在中央区的活动总时间、周围区域的停留时间;每只动物测试完毕,及时清理行为箱,并用75%酒精擦拭去除气味。

新物体识别实验中,首先将完全相同的物体A和B置于箱体中,位置分别为距离两侧箱壁10 cm处;随后将小鼠背对物体放入行为箱内与A、B物体等距离处,任其自由探索10 min进行熟悉。此过程结束后,将物体B换成大小相近、形状和颜色不同的新物体C,再次将小鼠背对物体放入行为箱中间,任其自由探索10 min;采用Smart 3.0小动物行为学记录分析系统分别记录分析小鼠在熟悉期、测试期对不同物体的探索时间,并计算识别指数。测试期探索旧物体A时间为T1、新物体C时间为T2,识别指数=T2/(T1+T2)×100%。识别指数的大小可评价动物的学习和记忆能力。将小鼠面向物体、且鼠鼻与物体间距离≤2 cm的时间定义为小鼠探索物体时间。

1.2.2 大脑血-脑脊液屏障通透性检测

采用EB检测大脑BBB的完整性。采用生理盐水配置2%的EB工作液,将EB工作液经小鼠尾静脉注射(8 mL/kg·bw)。1 h后采用生理盐水经心脏灌注去除血管中残留EB;然后将大脑取出,并取适量大脑组织匀浆采用甲酰胺匀浆,匀浆液4℃、12 000 r/min、离心15 min。收集上清液,采用酶标仪分别测量各组小鼠脑组织匀浆在635 nm处的OD值。

1.2.3 大脑组织Cd含量测定

采用石墨炉原子吸收分光光度法进行Cd测定。首先配制不同浓度的Cd标准溶液,然后进样

检测获得 OD 值;以 OD 值为自变量、Cd 浓度为因变量建立回归方程。精确称取 0.1 g 小鼠大脑组织,加入硝酸后采用微波消解仪消化脑组织,并将消化液定容至 5 mL;将定容后液体进行适当倍数稀释后测定其 OD。根据 OD 值、脑组织质量及稀释度分别计算各动物脑组织 Cd 含量。

1.2.4 大脑冰冻切片制备

将 4%多聚甲醛固定的大脑转移至 30%蔗糖溶液进行脱水;大脑沉至底部,取出大脑,采用冷冻切片机制作厚度为 30 μm 的冠状冰冻切片。

1.2.5 免疫组织化学染色

冰冻切片经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 润洗;经 1% H_2O_2 处理消除内源性过氧化物酶;4%山羊血清封闭后,分别置于含有特异性抗 NeuN 抗体的溶液 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日与辣根过氧化物酶标记二抗反应,然后采用金属增强 DAB 显色;依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片,显微镜下观察神经元的情况,并采用 Image J 对图像进行定量分析。

1.2.6 大脑切片免疫双荧光染色

冰冻切片经 PBS 润洗;1% H_2O_2 处理消除内源性过氧化物酶;4%山羊血清封闭,首先置于含有特异性抗 NeuN 抗体的溶液 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日洗涤冰冻切片,置于含有特异性抗 GSDMD 抗体的溶液 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,之后洗涤并与含不同种属荧光二抗抗体孵育 1 h, PBS 洗涤后封片,采用荧光显微镜观察。

1.2.7 Western blotting

称取适量大脑组织加入蛋白裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,采用生物样品均质仪进行组织匀浆;匀浆液经 4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心,取上清

液;同样条件再次离心收取上清液;BCA 法测量上清液蛋白质浓度。取适量上清液加入上样缓冲液制作电泳样品;样品经 100 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min 后,进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质;电泳完毕,将凝胶中蛋白质转移至 PVDF 膜;经 3%脱脂奶粉封闭,分别与特异性一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜 (一抗稀释比例均为 1:1 000),然后与辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h,采用 ECL 发光液显色目标蛋白带,Image J 软件分析蛋白表达水平。 β -actin 蛋白作为内参蛋白。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 26.0 进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 软件进行分析作图。所有数据结果显示以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cd 和 MPs 单独和联合暴露对小鼠大脑重量的影响

12 周末,与对照组相比,Cd 组、MPs 组小鼠大脑重量差异无统计学意义 ($P>0.05$);Cd+MPs 组小鼠大脑重量明显低于对照组、Cd 组和 MPs 组 ($P<0.05$),但各组小鼠大脑/体质量比值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

对大脑匀浆液进行 EB 检测显示,与对照组相比,Cd 组、MPs、Cd+MPs 联合组小鼠大脑 OD 均明显升高 ($P<0.05$),其中以 Cd+MPs 联合组为最高,但与 Cd 组、MPs 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。

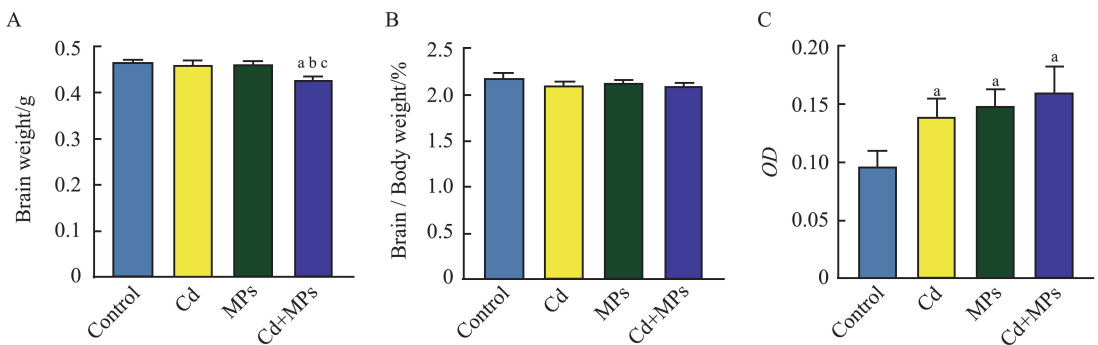


图 1 镉单独和联合微塑料暴露对小鼠脑组织的影响 (注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Cd 组相比,^b $P<0.05$;与 MPs 组相比,^c $P<0.05$)

A: 小鼠脑组织质量;B: 小鼠脑/体质量 (%);C: 小鼠脑组织匀浆 OD 值。

Figure 1 Effects of cadmium individual and combined with microplastics on mouse brain tissue (Note: group, ^a $P<0.05$; compared with Cd group, ^b $P<0.05$; compared with MPs group, ^c $P<0.05$)

A: Brain weight of mice; B: Brain weight/body weight (%) of mice; C: The Evans blue OD value of mice brain homogenate

2.2 Cd 和 MPs 单独和联合暴露对小鼠大脑 Cd 含量的影响

采用石墨炉原子吸收分光光度计对动物大脑 Cd 含量进行检测。结果显示,对照组、MPs 处理动物大脑中 Cd 含量较低,平均含量分别为 $0.017 \mu\text{g/g}$ 和 $0.010 \mu\text{g/g}$;Cd 暴露小鼠大脑 Cd 含量明显升高,平均含量为 $0.055 \mu\text{g/g}$,Cd+MPs 联合组动物大脑中 Cd 含量为 $0.117 \mu\text{g/g}$,与对照组、Cd 组和 MPs 组相比,Cd+MPs 联合组脑中 Cd 含量显著升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.3 Cd 和 MPs 单独和联合暴露对小鼠认知功能的影响

旷场实验结果显示,与对照组小鼠相比,Cd 组、MPs 组和 Cd+MPs 联合组小鼠在周围区停留时间均高于对照组($P<0.05$);Cd 组、MPs 组和 Cd+MPs 联合组小鼠在中央区活动时间均低于对照组($P<0.05$),Cd+MPs 联合组与 Cd 组和 MPs 组相比,小鼠在中央区活动时间有下降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

新物体识别实验结果显示,与对照组相比,Cd

组、MPs 组、Cd+MPs 联合组小鼠识别指数均明显降低,其差异均有统计学意义($P<0.05$),其中 Cd+MPs 联合组识别指数最低,但与 Cd 组和 MPs 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

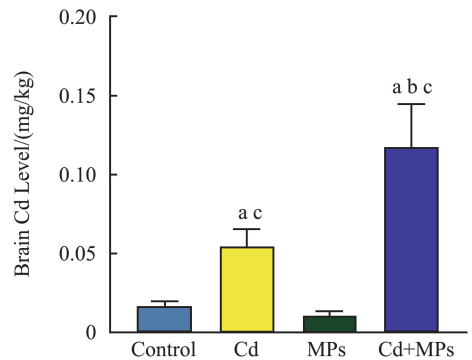


图 2 各组小鼠脑组织镉含量 (注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Cd 组相比,^b $P<0.05$;与 MPs 组相比,^c $P<0.05$)

Figure 2 Cadmium content in brain of mice in different groups (Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with Cd group, ^b $P<0.05$; compared with MPs group, ^c $P<0.05$)

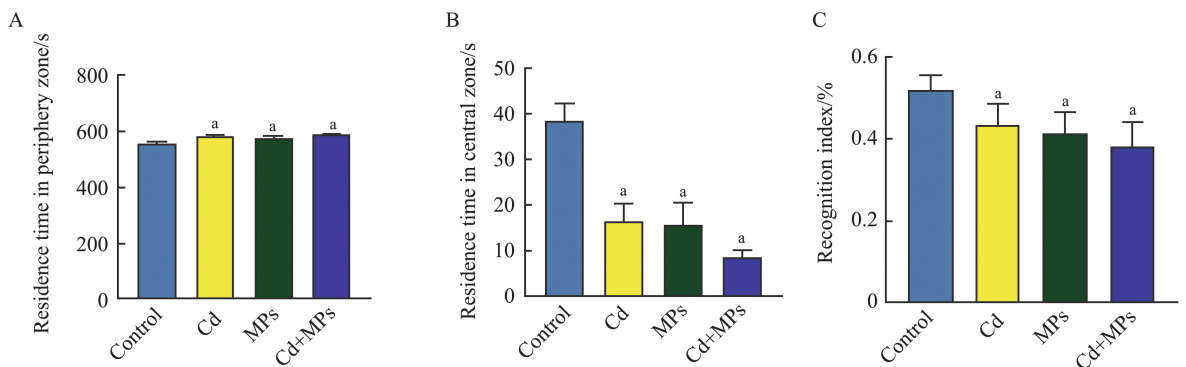


图 3 镉单独和联合微塑料暴露对小鼠神经行为学的影响(注:与对照组相比,^a $P<0.05$)

A: 旷场实验中小鼠在周围区的停留时间;B: 旷场实验中小鼠在中央区的停留时间;C: 新物体识别实验中小鼠识别指数。

Figure 3 Neurobehavioral changes in mice induced by cadmium and microplastics individual and combined exposure (Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$)

A: The residence time in peripheral area of mice in open field test; B: The residence time in the central region of mice in open field test; C: Recognition index of mice in new object recognition experiment.

2.4 Cd 和 MPs 单独和联合暴露对小鼠大脑神经元的影响

采用大脑冷冻切片,对神经元标志蛋白 NeuN 进行免疫组化染色。结果显示,对照组小鼠大脑皮层神经元密度大、排列紧密,Cd 及 MPs 单独及联合处理小鼠,其大脑皮质神经元表现为不同程度的密度下降、细胞排列松散,且观察到少许细胞

空泡化现象。Image J 对神经元计数显示,与对照组相比,Cd 组、MPs 组和 Cd+MPs 联合组神经元降低均具有统计学意义($P<0.05$)。Western blotting 对 NeuN 蛋白表达定量分析与免疫组化结果一致,与对照组相比,Cd 组、MPs、Cd+MPs 联合组均呈下降趋势,其中 Cd+MPs 联合组明显低于对照组($P<0.05$)。见图 4。

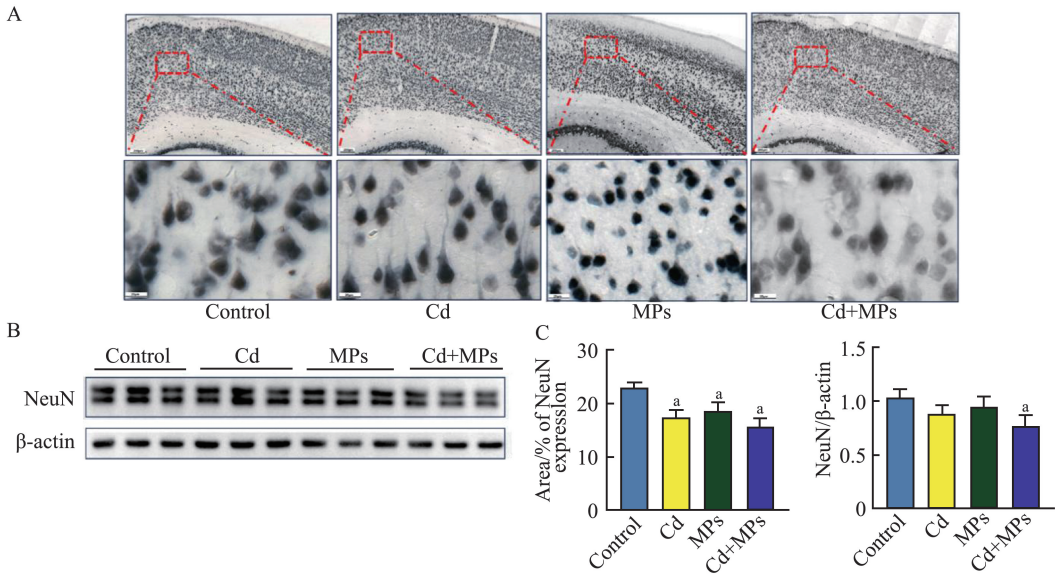


图4 镉单独和联合微塑料暴露对小鼠大脑皮层神经元的改变(注:与对照组相比,^a $P<0.05$)

A: NeuN 免疫组化染色;B: NeuN 蛋白代表条带;C: NeuN 免疫组化染色定量分析;D: NeuN 蛋白表达定量分析。

Figure 4 Changes of mice neuron loss induced by cadmium and microplastics individual and combined exposure (Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$)

A: Immunohistochemical staining of the NeuN; B: Representative Western blotting bands of NeuN protein; C: Quantification of NeuN immunohistochemical staining; D: Quantification of NeuN protein expression.

2.5 Cd 和 MPs 单独和联合暴露对小鼠大脑突触蛋白的影响

采用 Western blotting 对大脑皮层突触蛋白进行检测。与对照组相比, Cd 组、MPs 组和 Cd+MPs 联合组小鼠大脑 PSD95 蛋白表达均降低, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组相比, MPs 组和

Cd+MPs 联合组 SYP 蛋白表达均降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组相比, Cd 组、MPs 组和 Cd+MPs 联合组小鼠 Syn-1 蛋白表达均明显降低 ($P<0.05$); 其中, Cd+MPs 联合组小鼠 Syn-1 蛋白也明显低于 Cd 组和 MPs 组 ($P<0.05$); MPs 组低于 Cd 降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 5。

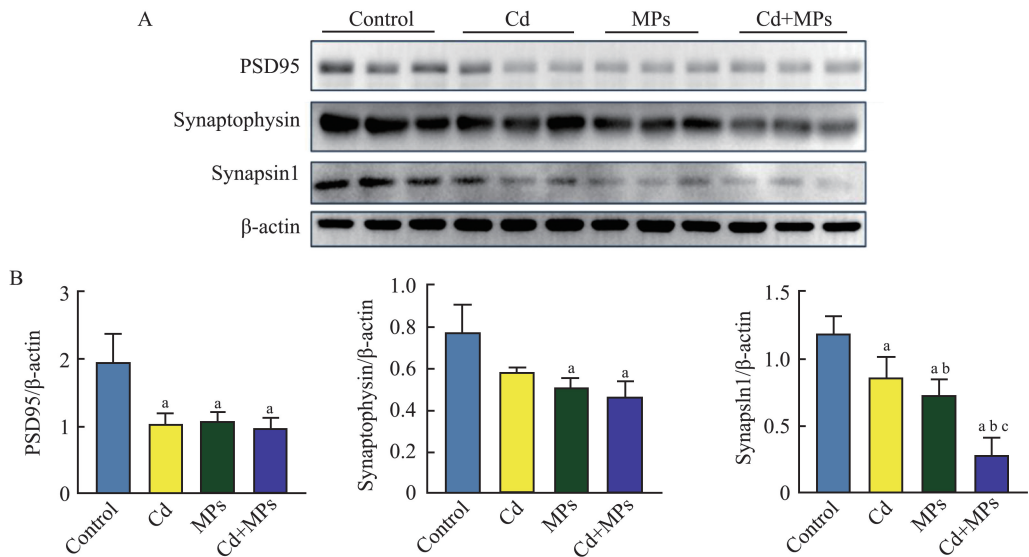


图5 镉和微塑料单独和联合暴露对小鼠大脑皮层突触蛋白的影响(注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Cd 组相比,^b $P<0.05$;与 MPs 组相比,^c $P<0.05$)

A: 突触相关蛋白表达代表条带;B: 突触相关蛋白表达定量分析。

Figure 5 Effects of cadmium and microplastics individual and combined exposure on synapse protein of cortex in mice (Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with Cd group, ^b $P<0.05$; compared with MPs group, ^c $P<0.05$)

A: Representative Western blotting bands of synapse-associated proteins; B: Quantification of synaptic associated proteins expression.

2.6 Cd和MPs单独和联合暴露对小鼠大脑NF- κ B信号通路的影响

采用Western blotting对小鼠大脑皮层NF- κ B通路蛋白进行检测。与对照组相比,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组大脑组织p-NF- κ B/总NF- κ B比

值有升高趋势,其中MPs组和Cd+MPs联合组升高显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。p-I κ B α /总I κ B α 变化趋势与上相同,与对照组相比,Cd+MPs联合组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图6。

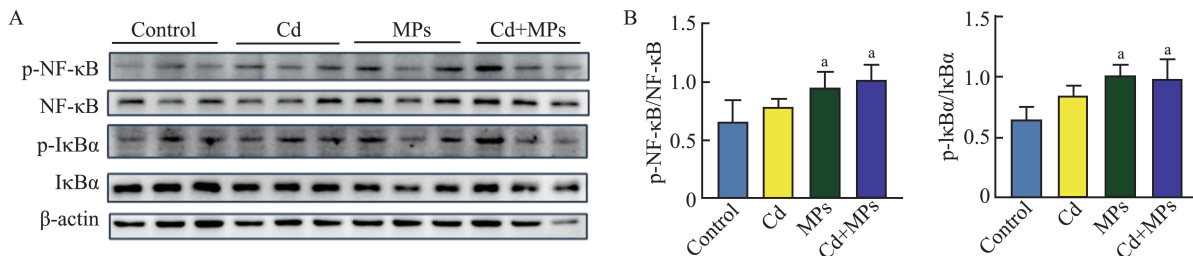


图6 镉和微塑料单独和联合暴露对小鼠大脑皮层NF- κ B信号通路的影响(注:与对照组相比,^a $P < 0.05$)

A: NF- κ B信号通路相关蛋白表达代表条带; B: NF- κ B信号通路相关蛋白表达定量分析。

Figure 6 Effects of cadmium and microplastics individual and combined exposure on NF- κ B signaling pathway in cortex of mice (Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$)

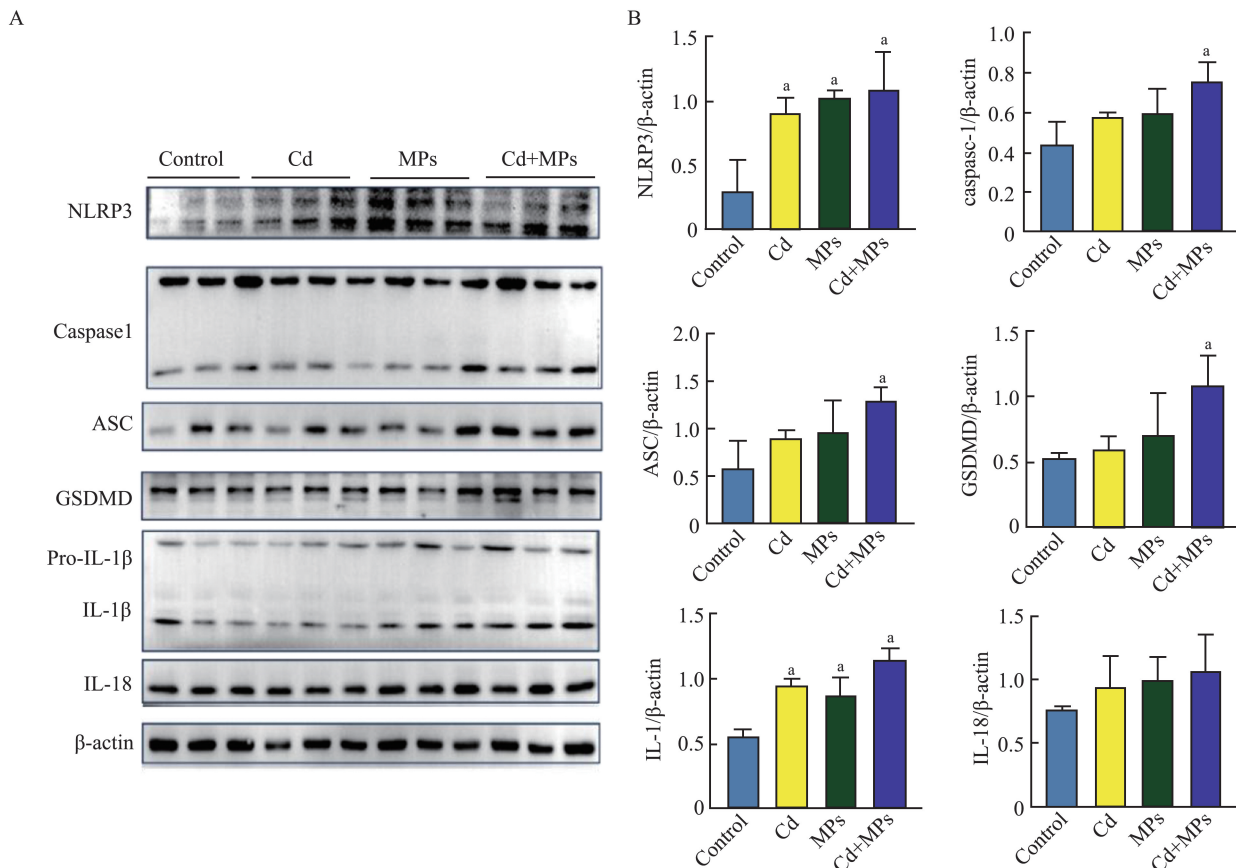
A: Representative Western blotting bands of NF- κ B signaling pathway associated proteins; B: Quantification of NF- κ B signaling pathway associated proteins expression.

2.6 Cd和MPs单独和联合暴露对小鼠大脑神经元焦亡的影响

采用Western blotting对小鼠大脑皮层炎性小体相关蛋白进行检测。与对照组相比,Cd组、MPs组和Cd+MPs联合组小鼠NLRP3和IL-1 β 表达均表现升高趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中

Cd+MPs联合小鼠大脑组织中Caspase-1、ASC、GSDMD蛋白表达显著升高。

将焦亡标志蛋白GSDMD与NeuN进行免疫荧光共染。与对照组相比,Cd组、MPs组以及Cd+MPs组小鼠均观察到GSDMD和NeuN共定位,其中以Cd+MPs组焦亡神经元最多。见图7。



A

B

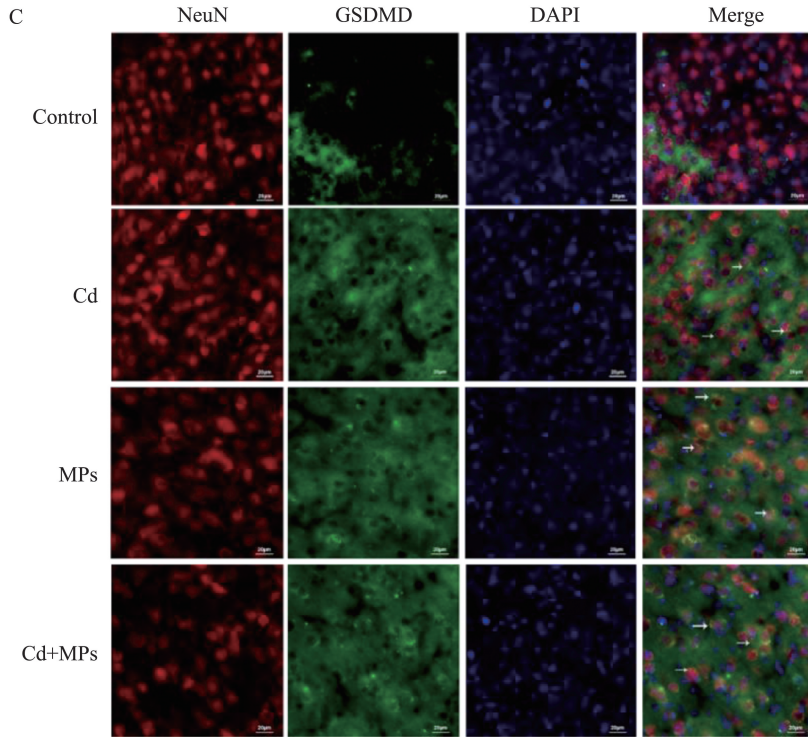


图7 镉和微塑料单独和联合暴露对小鼠大脑皮层神经元焦亡的影响(注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;标尺=20 μm)

A: 焦亡相关蛋白表达代表条带; B: 焦亡相关蛋白表达定量分析; C: 小鼠大脑 NeuN 与 GSDMD 免疫荧光双染共定位。

Figure 7 Effects of cadmium and microplastics individual and combined exposure on pyroptosis of neuron in cortex of mice (Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; scale bar=20 μm)

A: Representative Western blotting bands of pyroptosis related proteins; B: Quantification of pyroptosis related proteins expression; C: Co-localization of NeuN and GSDMD by immunofluorescence double staining in mice brains.

3 讨论

认知是大脑接受外界信息,获取及加工利用信息的过程,任何引起大脑皮质和海马区域结构和功能异常的因素都有可能引起认知障碍^[11]。近年来的研究显示,认知功能障碍的发生发展与环境污染密切相关^[12]。通常认为由脑微血管内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞等组成的 BBB 可保护大脑免受有毒有害物质的侵害^[13]。但研究显示 Cd 能够透过 BBB 进入大脑,并通过神经炎症、损伤神经元线粒体、破坏突触功能等机制损伤认知功能^[14],例如,Althagafy 等^[15]连续 5 d 对 Wistar 大鼠经腹腔注射 6.5 mg/kg·bw 的 CdCl₂,发现 Cd 暴露大鼠神经元萎缩,尼氏体颗粒分布异常,ELISA 检测大脑前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平上升,Western blotting 显示大鼠大脑炎症小体相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、ASC 表达上升。MPs 属于环境新污染物,也被认为对神经系统具有损伤作用。Yang 等^[16]研究显示,小鼠经灌胃给予 10 mg/kg·bw 纳米 MPs 连续 2 个月, Morris 水迷宫实验显示小鼠认知功能下降。目前尚未见到 MPs 与 Cd 联合暴露对神经损伤的报

道。但有研究观察到 MPs 和金属 Cu 联合暴露斑马鱼胚胎,导致其神经元增殖、神经发生和运动元发育相关基因下调,伴随 DNA 甲基转移酶表达降低,以及视网膜和大脑中增殖细胞核抗原阳性细胞的显著减少^[17]。Liu 等^[18]通过饮水给予小鼠柠檬酸铁铵与 MPs 联合暴露 3 个月,新物体识别实验显示,联合暴露小鼠认知功能下降,大脑表现为脂质过氧化增强及神经炎症,且观察到神经元铁死亡。本研究观察到,小鼠在持续给予相对低剂量的 Cd 和 MPs 单独或联合暴露均可观察到认知功能障碍,同时伴随认知相关脑区神经炎症和神经元的焦亡;实验也观察到两者联合暴露在一定程度上加重了大脑的炎症反应和神经元损伤。

本研究对大脑中 Cd 含量水平的检测显示,Cd 以及 Cd 和 MPs 联合暴露组小鼠大脑中 Cd 含量明显升高,证实 Cd 确实能够透过 BBB 进入大脑。两者联合暴露明显增加了小鼠大脑 Cd 含量。如前所述,MPs 粒径较小且表面积大,吸附力强,极易吸附并作为重金属的载体。有研究显示,MPs 携带 Cd 能增加组织中 Cd 蓄积,并导致机体发生不可逆的损伤^[19]。已知 BBB 为一特化结构,其中内皮细胞间为紧密连接,金属离子通常需要借助内皮细胞膜

上溶质载体经易化扩散进入脑内^[20]。本研究采用伊文思蓝对大脑 BBB 通透性检测显示, Cd 和 MPs 暴露均增加了 BBB 的通透性, 且两者联合对 BBB 的损伤加重。因此, 推测两者共存情况下, 对 BBB 损伤加重, 通透性增加, 以及 MPs 吸附 Cd 增加了大脑 Cd 水平。

突触是神经元之间功能上发生联系的部位, 也是信息传递的关键部位。突触可塑性的调节与认知和学习记忆功能密切相关。结构上, 突触由突触前膜、突触间隙、突触后膜三部分组成, 突触前膜中含有神经递质的囊泡, 突触后膜包含接收神经递质的受体^[21]。Syn-1、SYP 以及 PSD95 分别是神经发育和海马神经元突触形成所必需的蛋白。其中 Syn-1 是突触形成和成熟过程中的关键蛋白; SYP 蛋白是突触可塑性和神经传递效率的标志; PSD95 参与调控突触后信号的传递^[22]。研究发现, Syn-1、SYP 以及 PSD95 的减少被认为是突触损伤的关键生物学标志物^[23]。本研究发现, Cd 和 MPs 暴露导致 3 种蛋白表达水平降低, 提示小鼠脑内神经元突触损伤, 联合暴露致损伤更为严重。

本课题组前期体内体外研究也证实, MPs 可穿过 BBB 引起额颞叶皮层及海马区域神经炎症和神经元损伤^[24]。Cd 也通过神经炎症、损伤神经元线粒体、破坏突触功能等机制损伤认知功能^[14]。近年来, 对人类慢性神经退行性疾病的研究提示, 认知功能障碍与脑内炎症反应密切相关^[25]。NF- κ B 是一类在细胞炎症信号传导中起关键作用的转录因子, NF- κ B 活化导致促炎细胞因子大量释放, 是炎症相关疾病的潜在机制^[26]。NF- κ B 通常以无活性的二聚体形式存在, 与 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 结合, 阻止 NF- κ B 转位至细胞核。当机体受到外源性刺激时, I κ B α 蛋白发生磷酸化, 进而释放 NF- κ B 蛋白, NF- κ B 进入细胞核并启动下游炎症相关靶基因的转录^[27]。本研究发现, Cd 和 MPs 暴露均会引起 p-I κ B α 以及 p-NF- κ B 蛋白水平升高, 其中联合暴露组升高最为显著, 提示 Cd 和 MPs 暴露均可导致小鼠大脑中发生炎症反应, 而两者联合暴露加重了脑内炎症。

细胞焦亡是一种与神经炎症相关的程序性细胞死亡形式, 神经元对脑内炎症反应敏感。细胞焦亡主要由 NLRP3 炎性小体激活后触发。NLRP3 通常由活化的 NF- κ B 激活, 被激活的 NLRP3 进一步活化 caspase-1, 活化 caspase-1 随后切割 GSDMD 蛋白, 将其分为 N 端和 C 端两个片段, N 端片段可在细胞膜表面形成孔道结构, 导致细胞器溶解和细胞

内炎症因子如 IL-1 β 和 IL-18 释放, 最终引起细胞发生焦亡^[28-29]。本研究中, Cd 和 MPs 暴露均会导致焦亡相关蛋白表达上升, 其中联合暴露组升高最为显著; 同时 GSDMD 荧光与 NeuN 荧光染色共定位, 证实神经元发生焦亡。

含 Cd 矿石等工业活动所产生的废渣污染, 以及农业生产中长期使用含 Cd 化肥农药均会造成土壤 Cd 污染^[30]。农作物对 Cd 有吸收和富集作用, 土壤中 Cd 可被农作物吸收和富集, 并经食物链进入人体, 导致其在人体内的蓄积, 危害健康^[31]。我国的塑料生产和使用量也一直位居世界首位, 尤其农用地膜、灌溉、有机肥使用均会造成土壤 MPs 污染^[32]。环境中 Cd 和 MPs 同存在, 自然环境中存在的 Cd 和 MPs 所带来的健康风险已受到广泛关注。作为共存的环境污染物, 对其联合暴露损伤效应进行观察和机制探索, 不仅为 MPs 和 Cd 的健康风险评估提供可靠数据, 同时也提示靶向脑内炎症可能是预防环境污染物致慢性神经退行性病变的有效措施。

参考文献:

- [1] 邹长伟, 江玉洁, 黄虹. 重金属镉的分布、暴露与健康风险评估研究进展[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(6): 225-243.
ZOU Changwei, JIANG Yujie, HUANG Hong. Distribution, exposure and health risk assessment of heavy metal cadmium: a review[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(6): 225-243.
- [2] Goyal T, Mitra P, Singh P, et al. Evaluation of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in occupationally cadmium exposed workers[J]. Work, 2021, 69(1): 67-73.
- [3] Choudhury TR, Riad S, Uddin FJ, et al. Microplastics in multi-environmental compartments: research advances, media, and global management scenarios[J]. J Contam Hydrol, 2024, 265: 104379. doi: 10.1016/j.jconhyd.2024.104379
- [4] Zhao BS, Rehati P, Yang Z, et al. The potential toxicity of microplastics on human health[J]. Sci Total Environ, 2024, 912: 168946. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.168946
- [5] Yang ZY, Wang MX, Feng ZH, et al. Human microplastics exposure and potential health risks to target organs by different routes: a review[J]. Curr Pollut Rep, 2023, 9(3): 468-485.
- [6] Ye JL, Qiu WY, Pang XY, et al. Polystyrene nanoplastics and cadmium co-exposure aggravated cardiomyocyte damage in mice by regulating PANoptosis pathway[J].

- Environ Pollut, 2024, 347: 123713. doi:10.1016/j.envpol.2024.123713
- [7] Zhang QP, Xia WT, Zhou XY, et al. PS-MPs or their co-exposure with cadmium impair male reproductive function through the miR-199a-5p/HIF-1 α -mediated ferroptosis pathway[J]. Environ Pollut, 2023, 339: 122723. doi:10.1016/j.envpol.2023.122723
- [8] 杨永浩,董文亚,刘静,等.山东省小麦粉镉污染状况调查及膳食暴露评估[J].中国食品卫生杂志,2023,35(7):1042-1048.
YANG Yonghao, DONG Wenya, LIU Jing, et al. Investigation of cadmium contamination in wheat flour and assessment on dietary exposure in Shandong Province[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(7): 1042-1048.
- [9] Song Y, Wang Y, Mao WF, et al. Dietary cadmium exposure assessment among the Chinese population[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177978. doi:10.1371/journal.pone.0177978
- [10] Senathirajah K, Attwood S, Bhagwat G, et al. Estimation of the mass of microplastics ingested—a pivotal first step towards human health risk assessment[J]. J Hazard Mater, 2021, 404: 124004. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124004
- [11] Lang M, Colby S, Ashby-Padial C, et al. An imaging review of the hippocampus and its common pathologies[J]. J Neuroimaging, 2024, 34(1): 5-25.
- [12] Hoppe M, Habib A, Desai RY, et al. Human brain organoid code of conduct[J]. Front Mol Med, 2023, 3: 1143298. doi:10.3389/fmmed.2023.114329
- [13] Li CX, Talukder M, Xu YR, et al. Cadmium aggravates the blood-brain barrier disruption via inhibition of the Wnt7A/ β -catenin signaling axis[J]. Environ Pollut, 2023, 324: 121400. doi:10.1016/j.envpol.2023.121400
- [14] Liu JY, Xie YR, Lu Y, et al. APP/PS1 gene-environmental cadmium interaction aggravates the progression of Alzheimer's disease in mice via the blood-brain barrier, amyloid- β , and inflammation[J]. J Alzheimers Dis, 2023, 94(1): 115-136.
- [15] Althagafy HS, Harakeh S, Azhari SA, et al. Quetiapine attenuates cadmium neurotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and pyroptosis[J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 660. doi:10.1007/s11033-024-09558-7
- [16] Yang QY, Dai HX, Cheng Y, et al. Oral feeding of nanoplastics affects brain function of mice by inducing macrophage IL-1 signal in the intestine[J]. Cell Rep, 2023, 42(4): 112346. doi:10.1016/j.celrep.2023.112346
- [17] Santos D, Luzio A, Bellas J, et al. Microplastics- and copper-induced changes in neurogenesis and DNA methyltransferases in the early life stages of zebrafish[J]. Chem Biol Interact, 2022, 363: 110021. doi:10.1016/j.cbi.2022.110021
- [18] Liu X, Yang HK, Yan XZ, et al. Co-exposure of polystyrene microplastics and iron aggravates cognitive decline in aging mice via ferroptosis induction[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 233: 113342. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113342
- [19] Yuan WK, Zhou YF, Chen YL, et al. Toxicological effects of microplastics and heavy metals on the Daphnia magna[J]. Sci Total Environ, 2020, 746: 141254. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141254
- [20] Candelario-Jalil E, Dijkhuizen RM, Magnus T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction, and imaging modalities[J]. Stroke, 2022, 53(5): 1473-1486. doi:10.1161/STROKEAHA.122.036946
- [21] Yang G, Gong CY, Zheng XY, et al. Early clues and molecular mechanism involved in neurodegenerative diseases induced in immature mice by combined exposure to polypropylene microplastics and DEHP[J]. Environ Pollut, 2023, 336: 122406. doi:10.1016/j.envpol.2023.122406
- [22] 雷昌亭,郑刘根,杨永浩,等.十溴二苯乙烷和豌豆肽对实验大鼠认知功能的影响[J].兰州大学学报(医学版),2023,49(11):18-25.
LEI Changting, ZHENG Liugen, YANG Yonghao, et al. Effects of DBDPE and pea peptide on cognitive function in experimental rat[J]. Journal of Lanzhou University(Medical Sciences), 2023, 49(11): 18-25.
- [23] Levy AM, Gomez-Puertas P, Tümer Z. Neurodevelopmental disorders associated with PSD-95 and its interaction partners[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4390. doi:10.3390/ijms23084390
- [24] Shan S, Zhang YF, Zhao HW, et al. Polystyrene nanoplastics penetrate across the blood-brain barrier and induce activation of microglia in the brain of mice[J]. Chemosphere, 2022, 298: 134261. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134261
- [25] Mao M, Liu R, Dong Y, et al. Resting heart rate, cognitive function, and inflammation in older adults: a population-based study[J]. Aging Clin Exp Res, 2023, 35(11): 2821-2829.
- [26] Preeti K, Sood A, Fernandes V. Metabolic regulation of Glia and their neuroinflammatory role in Alzheimer's disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(8): 2527-2551.
- [27] Liu FZ, Zhao YK, Pei YR, et al. Role of the NF- κ B signalling pathway in heterotopic ossification: biological and therapeutic significance[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 159. doi:10.1186/s12964-024-01533-w
- [28] Xu TC, Cui J, Xu R, et al. Microplastics induced

- inflammation and apoptosis via ferroptosis and the NF- κ B pathway in carp[J]. *Aquat Toxicol*, 2023, 262: 106659. doi:10.1016/j.aquatox.2023.106659
- [29] Wang KT, Wang A, Deng JP, et al. Rivaroxaban down-regulates pyroptosis and the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway to promote flap survival[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 128: 111568. doi: 10.1016/j.intimp.2024.111568
- [30] Shi JD, Zhao D, Ren FT, et al. Spatiotemporal variation of soil heavy metals in China: The pollution status and risk assessment [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 871: 161768. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.161768
- [31] Huang FY, Hu JZ, Chen L, et al. Microplastics may increase the environmental risks of Cd via promoting Cd uptake by plants: a meta-analysis[J]. *J Hazard Mater*, 2023, 448: 130887. doi: 10.1016/j.jhazmat. 2023.130887
- [32] Cao L, Wu D, Liu P, et al. Occurrence, distribution and affecting factors of microplastics in agricultural soils along the lower reaches of Yangtze River, China[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 794: 148694. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148694
- (编辑:李伟)
- (上接第43页)
- [16] Plessl D, Salomon B, Salomon B, et al. Rapid versus standard recovery protocol is associated with improved recovery of range of motion 12 weeks after total knee arthroplasty[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2020, 28(21): e962-e968.
- [17] 谷斌, 陈绪娜, 张千坤, 等. 全髌关节置换术后患者渐进式平衡训练方案的制订与应用[J]. *中华护理杂志*, 2020, 55(10): 1458-1464.
- GU Bin, CHEN Xuna, ZHANG Qiankun, et al. Formulation and application of a progressive balance training program after total hip arthroplasty[J]. *Chinese Journal of Nursing*, 2020, 55(10): 1458-1464.
- [18] 程文昌, 霍少川, 刘付懿斐, 等. 等速肌力训练对老年人膝关节肌力和跌倒风险的影响[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(19): 107-110.
- CHENG Wenchang, HUO Shaochuan, LIU Fuyifei, et al. Effect of isokinetic strength training on knee muscle strength and fall risk in the elderly[J]. *China Medical Herald*, 2022, 19(19): 107-110.
- [19] 李宽, 王春方, 孙长城, 等. 限弧等速肌力训练对于髌股关节炎髌骨轨迹的影响[J]. *中国康复*, 2020, 35(8): 413-417.
- LI Kuan, WANG Chunfang, SUN Changcheng, et al. Effect of arc limitation isokinetic muscle strength training on the mal-patellar tracking of patients with patellofemoral arthritis[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation*, 2020, 35(8): 413-417.
- [20] 杜建平, 任薇, 夏能能, 等. 等速肌力训练对改善膝骨关节炎肌肉功能的 Meta 分析[J]. *中国康复*, 2020, 35(11): 594-599.
- DU Jianping, REN Wei, XIA Nengneng, et al. Meta-analysis of isokinetic muscle strength training for improving muscle function in knee osteoarthritis[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2020, 35(11): 594-599.
- [21] 于海霞, 刘晓洁, 冷珊珊. 等速肌力训练在膝关节置换术后康复中的应用效果研究[J]. *成都医学院学报*, 2023, 18(2): 191-194.
- YU Haixia, LIU Xiaojie, LENG Shanshan. Effect of isokinetic muscle strength training in patients after knee arthroplasty[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2023, 18(2): 191-194.
- [22] 刘强, 杨曼, 熊小云, 等. 本体感觉训练对膝关节骨性关节炎患者全膝关节置换术后本体感觉及膝关节功能的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2021, 38(2): 180-183.
- LIU Qiang, YANG Man, XIONG Xiaoyun, et al. Effect of proprioception training on proprioception and knee joint function after total knee arthro-plasty in patients with knee joint osteoarthritis [J]. *Journal of Xinxiang Medical University*, 2021, 38(2): 180-183.
- [23] 李瑾, 宋佳凝, 李健, 等. 本体感觉训练联合肌内效贴对全膝关节置换术后患者膝关节功能与本体感觉的影响[J]. *中国康复*, 2022, 37(3): 145-148.
- LI Jin, SONG Jianing, LI Jian, et al. Effects of proprioception training and kinesio taping on knee function and proprioception in patients after total knee arthroplasty [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2022, 37(3): 145-148.
- (编辑:徐苗蓁)