

大气颗粒物 PM_{2.5} 诱导 C57BL/6J 小鼠大脑脂代谢紊乱的实验研究

摘要

目前,大气污染是全球共同面临的重要环境问题,其中大气颗粒物中粒径小于 2.5 µm 的细颗粒物(fine particulate matter, PM_{2.5})是对环境和人体健康造成危害最严重的一类大 气污染物。现有研究发现, PM2.5 能够导致大脑神经毒性, 诱导氧化应激和炎症反应, 引发 脂代谢紊乱,但是相关的机制研究不够深入。因此,本研究通过观察脑组织形态学、相关神 经元表达水平、大脑脂质水平以及相关脂代谢基因表达水平的影响,探讨 PM25对小鼠大脑 脂代谢紊乱的机制研究。将 12 只 C57BL/6J 野生型小鼠,进行随机分组,其中 6 只 C57 BL/6J 小鼠作为阴性对照,另外 6 只小鼠作为 PM_{2.5} 暴露实验组。实验组小鼠经鼻暴露 100 μg/天/ 只 PM_{2.5}剂量连续暴露 2 个月(每周 5 天暴露)。随后分离试验小鼠大脑组织,包埋后进行 冰冻切片, 检测 PM_{2.5} 暴露对小鼠大脑病理及脂代谢的影响。使用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法检测小鼠脑组织形态学改变,油红 O 染色法检测脂滴水平 变化。通过免疫荧光染色,分别检测相关神经元蛋白微管蛋白β3(beta III tubulin, Tuj)、胆 碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 以及相关脂代谢调节蛋白胆固醇调节元件结 合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins 1, SREBP-1)、过氧化物酶体增殖物激活受 体γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ)的表达水平。实验结果显示, PM_{2.5} 暴露可以引起 C57BL/6J 小鼠大脑组织海马、皮质区组织形态学炎性改变, 降低胆碱能 神经元蛋白表达水平,减少皮质中胆碱能神经元在总神经元中的占比,使小鼠大脑海马、皮 质区脂质积累显著增加,上调脂代谢关键转录调控因子 SREBP-1 表达,而抑制脂代谢主要 调节因子 PPARy的表达。同时,PM2.5 暴露可以显著增加海马体总神经元的表达,对皮质总 神经元蛋白表达水平没有明显影响。我们的实验表明,PM25通过滴鼻灌注进入C57BL/6J 小鼠大脑内,使小鼠大脑组织发生病理改变,抑制胆碱能神经元的表达,引起脂质积累,同 时脂质代谢相关调节因子蛋白表达改变,并介导氧化应激与炎症反应,进而导致神经性退行 性病变的发生发展。

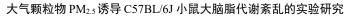
关键字: PM_{2.5}, 大脑, 神经系统, 脂代谢, 炎症反应



EXPERIMENT STUDY ON CEREBRAL LIPID METABOLISM DISORDER OF C57BL/6J MICE INDUCED BY ATMOSPHERIC PARTICULATE MATTER PM_{2.5}

ABSTRACT

At present, air pollution is an important environmental problem faced by all the world, among which the fine particulate matter (PM_{2.5}) with particle size less than 2.5 µm is the most serious type of atmospheric pollutant that causes harm to the environment and human health. Existing studies have found that PM_{2.5} can cause neurotoxicity in the brain, triggering oxidative stress and inflammation, and therefore inducing lipid metabolism disorders, but the relevant mechanism has not been thoroughly studied. Therefore, this study explored the mechanism of PM_{2.5} on lipid metabolism disorders in the brain of mice by observing the effects of brain histology, expression levels of related neurons, brain lipid levels and expression levels of related lipid metabolism genes. Twelve C57BL/6J wild-type mice were randomly divided into groups where one contained 6 C57BL/6J mice as the negative control group and another included 6 mice as the PM_{2.5} exposure group. Mice in experimental group were exposed intranasally to 100 μg/ day PM_{2.5} dose per mouse for 2 months (5 days per week exposure). The brain tissues of the experimental mice were then isolated and embedded for frozen sections to detect the effects of PM_{2.5} exposure on the brain pathology and lipid metabolism of the mice. Hematoxylin-Eosin (HE) staining was used to detect the morphologic changes of brain tissue in mice, and the changes of lipid droplets were examined by oil red O staining. The expression levels of related neuronal proteins including beta III tubulin (Tuj), choline acetyltransferase (ChAT) and related lipid metabolism regulatory proteins including sterol regulatory element-binding proteins 1 (SREBP-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARy) were measured by immunofluorescence staining. The results showed that PM_{2.5} exposure could cause histological inflammatory changes both in the hippocampus and cortical areas of the brain of C57BL/6J mice, reduce the protein expression level of cholinergic neurons, reduce the proportion of cholinergic neurons in total neurons in the cortex, significantly increase lipid accumulation both in the hippocampus and cortical areas of the brain of mice, upregulate the expression of SREBP-1, a key transcriptional regulator of lipid metabolism, and inhibit the expression of PPARγ, a major regulatory factor of lipid metabolism. Furthermore, PM2.5 exposure significantly increased the expression of total neurons in the hippocampus, but has no significant effect on the protein expression level of total neurons in the cortex. Study revealed that PM2.5 entering the brain





through intranasal infusion resulted in pathological changes of brain tissue in mice, and can inhibit the expression of cholinergic neurons. Moreover, it can cause lipid accumulation, the lipid metabolism related regulatory factor protein expression changes, and mediate oxidative stress and inflammation, which in turn lead to the occurrence and development of neurodegenerative diseases.

Key words: PM_{2.5}, brain, CNS, lipid metabolism, inflammatory reaction



目 录

第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 大脑与脂代谢	1
1.2.1 大脑的脂代谢	1
1.2.2 大脑脂代谢紊乱与 CNS 疾病	2
1.3 PM _{2.5} 与脂代谢紊乱	2
1.4 PM _{2.5} 与大脑损伤	3
1.4.1 PM _{2.5} 进入大脑的途径	3
1.4.2 PM _{2.5} 致大脑损伤的机制	3
第二章 材料和方法	4
2.1 实验试剂	4
2.2 实验仪器	4
2.3 实验动物	4
2.4 实验试剂配制	_
2.5 实验方法	5
2.5.1 冰冻切片制备	5
2.5.2 HE 染色检测海马、皮质细胞组织学改变	
2.5.3 免疫荧光染色检测海马、皮质神经元相关蛋白表达水平	5
2.5.4 油红 O 染色检测海马、皮质组织脂滴水平	
2.5.5 免疫荧光染色检测海马、皮质脂代谢相关蛋白表达水平	6
2.6 图像处理及统计学分析	6
第三章 实验结果	
3.1 PM _{2.5} 暴露导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质损伤	7
3.1.1 组织学改变	7
3.1.2 相关神经元蛋白表达情况	
3.2 PM _{2.5} 暴露导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质区脂质改变	9
3.2.1 脂滴水平改变	
3.2.2 脂代谢相关蛋白表达情况	10
第四章 讨论	12
4.1 PM _{2.5} 对小鼠大脑病理的影响	
4.2 PM _{2.5} 对小鼠大脑脂代谢的影响	13
第五章 结论	15
发表论文情况	16
参考文献	
致谢	21



第一章 绪论

1.1 引言

目前,大气污染是全球共同面临的重要环境问题,而大气颗粒物中的细颗粒物(fine particulate matters, $PM_{2.5}$)是对环境和人体健康造成危害最严重的一类大气污染物。中国环境保护部发布报告[1]显示,2020年全国 $PM_{2.5}$ 年平均浓度为 33 $\mu g/m^3$,明显高于世界卫生组织提出的 $PM_{2.5}$ 年平均浓度建议值 10 $\mu g/m^3$ 。 $PM_{2.5}$ 是一类空气流体动力学直径等于或小于 2.5 μm 的大气颗粒物,以悬浮在空气中的固体颗粒和液滴混合物的形式广泛存在,主要来源于汽车尾气排放、工业燃料燃烧等。其组成成分丰富多样,包括各类有机与无机成分。其中,有机成分包括多环芳烃(苯并α芘,苯并α蒽等)、有机碳等,而无机成分包括硫酸盐、硝酸盐和各种金属如钠、镁、铅、镉等[2]。

 $PM_{2.5}$ 可通过呼吸直接进入支气管和肺泡,进一步透过肺部的血气屏障进入外周血液循环和中枢神经系统(central nervous system, CNS)[31 ,可引起支气管和肺部的疾病[41 、严重的心脑血管系统疾病[51 、CNS 损伤和各类神经退行性疾病,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和帕金森病(Parkinson's disease, PD)等[2,61 。在这些 $PM_{2.5}$ 导致的全身各系统损伤当中,以心脑血管系统受损最为严重,包括引起冠心病、动脉硬化、心肌梗死以及中风等。目前,关于 $PM_{2.5}$ 对大脑生物学损害机制的研究十分广泛, $PM_{2.5}$ 暴露主要导致大鼠脑神经毒性,包括氧化应激、线粒体结构损伤和细胞死亡[17]。氧化应激及炎症反应是 $PM_{2.5}$ 致机体慢性受损的主要机制。 $PM_{2.5}$ 引起的氧化应激可以通过引发脂代谢紊乱,进而加剧神经退行性疾病的发生和发展。另外,急性炎症反应能够保护机体降低损伤,这一过程需要脂质介质如前列腺素、白三烯和其他细胞因子的相互作用,因此炎症反应也可能影响脂质代谢的合成[81]。 $PM_{2.5}$ 也具有潜在的中枢神经毒性[41]。被吸入肺后,其中的超微颗粒物(粒径小于0.1 μ m 颗粒物)容易通过血-气屏障直接进入血液循环系统,再穿过血-脑屏障,进而直接引起中枢神经炎症和 CNS 损伤。

1.2 大脑与脂代谢

1.2.1 大脑的脂代谢

脂质作为人体必需营养素之一,是一大类非均一、物理性质和化学性质相近并能被机体有效利用的有机化合物,包含甘油三酯、胆固醇和磷脂等各种脂肪和类脂,在机体生长发育以及稳态的维持方面发挥重要作用。大脑是人体中富含脂质的器官,脂质及其代谢产物对维持大脑正常的功能、神经发育^[9,10]、中枢神经系统疾病发生与发展^[11,12]和药物治疗效果^[13,14]有重要意义。

大脑组织中,脂质既是重要的能量来源和信号传递分子,也是神经元扩展和髓鞘构建所必需的物质。神经元传递信息所必需的动作电位的产生主要取决于轴突周围质膜的通透程度,而此特性在一定程度上由构成质膜的胆固醇和其他脂质分子的特性决定。同时,神经元的突触和髓鞘在其生长发育的过程中不断进行重塑,是神经系统从损伤、老化和其他疾病中重新恢复能力的基础。脂质在突触与髓鞘的构建及功能中起到重要作用,因为神经元突触前膜富含鞘脂,使得脂质及其代谢物能够调节突触小泡内吞作用。髓鞘膜也同样富含脂质,多种由脂代谢紊乱引起或与之相关的疾病均可直接或间接破坏髓鞘的结构完整性[15]。Ando等[16]对成年小鼠的实验室研究结果表明,小鼠髓鞘中相关脂质的更新作用是存在且必要的。



1.2.2 大脑脂代谢紊乱与 CNS 疾病

大脑脂质代谢的紊乱与疾病早期的发生发展紧密相关,如在下丘脑中脂质及其代谢产物的过度积累引起的机体脂质代谢紊乱,被医学界公认为是导致肥胖的一个关键发病机制[17]。除此之外,AD和PD等常见的CNS疾病,也被发现可能与脂代谢紊乱相关。有研究表明,脑内磷脂和鞘脂的水平变化可能与AD患病率增加和脑缺血损伤有关[18]。

1.3 PM_{2.5} 与脂代谢紊乱

PM_{2.5}是诱发支气管、肺部疾病和其他心脑血管系统疾病的危险因素。目前,对于 PM_{2.5} 引发机体其他器官的损伤逐渐成为研究焦点,其中包括其导致代谢紊乱的广泛探索。

肝脏作为人体全身脂代谢的关键场所,是 PM_{2.5} 导致脂代谢紊乱的重要靶器官。有研究表明,空气污染可以导致肥胖、胰岛素抵抗、肝脏脂质含量增加^[19,20]。PM_{2.5} 可以通过多种途径从肺转移至肝脏^[21],导致氧化应激,表现为肝脏炎症、肝脏脂质代谢紊乱和脂肪变性的特征^[22]。在长期暴露于 PM_{2.5} 的小鼠体内,促炎细胞因子 TNF-α的表达水平显著升高,进而引起氧化应激及肝脏炎症水平的升高,破坏了肝脏代谢平衡,且这种代谢紊乱呈现剂量依赖性的特征^[23]。使用相关抑制剂阻断氧化应激信号通路后,再暴露于 PM_{2.5},结果显示,小鼠肝组织中炎症反应和氧化应激相关基因的表达受到抑制,同时与脂质积累相关的基因表达水平也显著降低,反向证明 PM_{2.5} 引起的氧化应激与炎症反应能够促进肝组织脂代谢异常。这与另一项相关实验^[24]显示 PM_{2.5} 可使小鼠肝脏脂质代谢紊乱,影响肝脏脂质合成、转运和分解代谢相关基因表达的结果一致。

 $PM_{2.5}$ 诱导的氧化应激与炎症反应除了导致肝脏损伤,也可能与机体其他损伤相关,进而导致血脂水平的异常。使用大鼠哮喘模型进行 $PM_{2.5}$ 暴露实验发现, $PM_{2.5}$ 通过上调哮喘大鼠的气道炎症水平以损伤机体和消耗脂肪;实验结果表明, $PM_{2.5}$ 促进高密度脂蛋白的生成,抑制甘油三酯、总胆固醇的产生 $[^{25]}$ 。这种效应可能是由于 $PM_{2.5}$ 通过呼吸过程经支气管和肺进入机体后,与肺上皮细胞及肺巨噬细胞接触并发生相互作用,释放大量细胞因子和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),从而诱发气道炎症和氧化损伤所致。ROS 进入血液循环后引起细胞脂质过氧化,进而导致血脂水平的异常 $[^{26]}$ 。除此之外, $PM_{2.5}$ 暴露导致的严重炎症反应使下丘脑受损,下丘脑作为 CNS 中接收和调控来自外周器官营养相关信息的区域,进而导致肥胖及脂质代谢紊乱 $[^{27,28]}$ 。

由此可见,氧化应激和炎症反应在 $PM_{2.5}$ 致肝脏乃至血液脂代谢紊乱的机制中占关键地位,但 $PM_{2.5}$ 对脂质代谢调节的影响机制仍有待进一步探究。

迄今已有许多 $PM_{2.5}$ 引发代谢紊乱的相关探索研究,而以 $PM_{2.5}$ 为整体探讨其对 CNS 损伤机制的研究也十分广泛。 $PM_{2.5}$ 经各种途径进入大脑后,以引发神经炎症和诱导氧化应激通路为主要损伤机制,而多种脂质作为维持 CNS 健康的重要因素,其在脑内的变化与 $PM_{2.5}$ 存在联系。

刘颖等^[29]研究发现,在与环境 $PM_{2.5}$ 和 PM_{10} 浓度相同的条件下单独暴露大气颗粒物以及高脂高糖饮食与颗粒物的联合暴露均会导致大鼠学习和记忆能力明显下降,提示大气颗粒物可诱导机体脂质稳态的异常,进而可能造成 CNS 功能损伤。另有一项体外实验^[30]解剖大鼠大脑,分离海马、小脑等不同脑区组织并于体外培养基培养,采用不同浓度的 $PM_{2.5}$ (0、3、5、10 µg/100 mg,以组织计)分别孵育 60min 后,检测发现,与对照组相比, $PM_{2.5}$ 暴露组的不同组织中脂质过氧化水平均升高。目前,台湾 Lee 等^[6]开展关于 $PM_{2.5}$ 导致大脑脂代谢紊乱的机制研究,通过使用定制吸入模型,使自发性高血压大鼠模型亚慢性暴露于模拟现实世界的 $PM_{2.5}$ 环境中 3 个月后,采用质谱法记录并分析了脑区各结构的脂质分布情况。结果显示, $PM_{2.5}$ 可以导致大鼠大部分脑区的脂质水平发生改变,以海马区改变最为明显,其中多不饱和二酰基磷脂酰胆碱水平显著增高,可能与维持神经膜完整性以应对 $PM_{2.5}$ 暴露



有关;而皮层中磷脂酰胆碱与鞘磷脂的下调可能反映了 $PM_{2.5}$ 引起细胞膜紊乱或细胞凋亡的早期迹象。这些脂质的改变可能是拮抗 $PM_{2.5}$ 诱导的氧化应激,另一方面,也可能是对 $PM_{2.5}$ 诱导的氧化损伤或炎症反应的应答。以上研究结果提示, $PM_{2.5}$ 对大脑各区域脂代谢均有影响。

1.4 PM_{2.5} 与大脑损伤

1.4.1 PM25 进入大脑的途径

PM_{2.5} 具有潜在的中枢神经毒性^[4]。被吸入肺后,其中的超微颗粒物(粒径小于 0.1μm 的颗粒物)容易通过血-气屏障直接进入血液循环系统,再穿过血-脑屏障,进而直接引起中枢神经炎症和 CNS 损伤。王婷婷等^[31]研究发现, PM_{2.5} 进入孕鼠体循环后,可能通过穿越胎盘屏障,通过胎鼠尚未发育完全的血-脑屏障,直接作用于胎鼠 CNS,从而导致炎症增加与神经胶质细胞激活。此外,眼睛和鼻腔也是 PM_{2.5} 暴露的途径。经过鼻腔的颗粒物可以穿过上皮屏障进入体循环,或移位至嗅神经轴突从而抵达 CNS^[32]; PM_{2.5} 还可以经眼眶引流传送至鼻腔鼻泪管,再进入 CNS^[33]。

1.4.2 PM25 致大脑损伤的机制

 $PM_{2.5}$ 组分中的多环芳烃和有机碳与神经元损伤之间存在极大相关性^[2]。在动物模型研究中的初步观察表明,大气颗粒物如黑碳或柴油废气,以及大气颗粒物当中的金属成分,如砷和镉,能够诱导基因特异性 DNA 甲基化的改变^[34-36];另有一项人类流行病学研究也发现,长时间暴露于黑碳和硫酸盐将导致 DNA 甲基化程度降低,但该研究局限于有基础疾病的老年男性,如果进一步推广至全人群还需进行更多实验调查^[37]。同时,由于 $PM_{2.5}$ 直径小、数量多、比表面积大、活性强、沉降速度慢等特点,因而许多化学物质、细菌和病毒以其为载体,随着呼吸过程与颗粒物一同进入人体,从而造成更多健康危害事件的发生。已有的动物模型与人类流行病学研究对于 $PM_{2.5}$ 中的有害成分损伤 CNS 的机制作出了较为科学的解释,然而,由于 $PM_{2.5}$ 复杂的组成成分与特殊的理化性质,如需完整清晰地探讨其中有害组分对机体的生物学损害机制仍需要进行深入研究。

目前,以 PM_{2.5} 为整体探讨其对 CNS 损伤机制的研究十分广泛,其中已被证实的机制主要有氧化应激、炎症反应、DNA 甲基化改变、胶质细胞激活、突触可塑性改变和细胞器损伤^[38]。

当下,对 $PM_{2.5}$ 的研究涉及方面广泛,对 $PM_{2.5}$ 引起机体各类不良健康事件的流行病学、临床特征研究也逐渐深入。许多科学实验证实, $PM_{2.5}$ 可引起机体呼吸系统、心血管系统发生功能紊乱,与神经系统结构功能损伤也有紧密联系。

PM_{2.5} 经各种途径进入大脑后,以引发神经炎症和诱导氧化应激通路为主要损伤机制,而多种脂质作为维持健康的重要因素,其在脑内的变化与 PM_{2.5}、神经系统疾病存在联系,但脂质在 PM_{2.5} 导致神经系统退行或损伤中的具体参与 机制还未被探索。最新研究已揭示暴露于环境水平 PM_{2.5} 引起大脑脂质内稳态变化的事实,因此,在充分了解 PM_{2.5} 导致大脑损伤的途径后,分析各脑区不同脂质发生的相应改变,并结合损伤机制中特定脂质的神经保护作用,抑或是促进炎症、氧化应激的作用,以分子流行病学角度为出发点,为临床研究提供依据,为干预环境大气污染造成的神经系统不良结局提供支持。



第二章 材料和方法

2.1 实验试剂

	生产厂家
OCT 包埋剂	德国 Leica
无水乙醇	上海沪试实验室器材股份有限公司
甲醇	上海沪试实验室器材股份有限公司
乙酸	上海沪试实验室器材股份有限公司
浓盐酸	上海沪试实验室器材股份有限公司
苏木精染液	生工生物工程
伊红染液	生工生物工程
中性树脂	生工生物工程
氯化钠	上海沪试实验室器材股份有限公司
氯化钾	上海沪试实验室器材股份有限公司
磷酸氢二钠	上海沪试实验室器材股份有限公司
磷酸二氢钾	上海沪试实验室器材股份有限公司
牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich
兔抗 Tuj 抗体	Abcam
鼠抗 ChAT 抗体	Abcam
兔抗 SREBP-1 抗体	Abcam
鼠抗 PPARγ抗体	Abcam
抗兔荧光二抗	Cell Signaling Technology
抗鼠荧光二抗	Cell Signaling Technology
免疫染色一抗稀释液	碧云天生物技术有限公司
免疫染色二抗稀释液	碧云天生物技术有限公司
4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)	Sigma-Aldrich
抗淬灭剂	Sigma-Aldrich
油红 O 粉末	生工生物工程
异丙醇	上海沪试实验室器材股份有限公司

2.2 实验仪器

仪器名称	生产厂家
冷冻组织切片机	德国 Leica
光学显微镜	日本 Nikon
激光扫描共聚焦显微镜	德国 Leica

2.3 实验动物

动物实验已经获得上海交通大学医学院实验动物中心动物和伦理审查委员会的批准。将



12 只 6 周龄雄性和雌性 C57BL/6J 小鼠 (购自上海南方模式生物研究中心) 保持在恒定适宜 温度和湿度下。在整个研究过程中,提供正常饮食和水,小鼠自由采食。

将 12 只雌雄各半的小鼠随机分为 $PM_{2.5}$ 处理组和对照组,分组完成后,逐步开展暴露实验。经过 2 周的驯化, $PM_{2.5}$ 处理组(n=6)的小鼠经鼻直接给予 $10~\mu L~PM_{2.5}$ 混悬液($100~\mu g~PM_{2.5}$ /天),持续 2 个月,而对照组(n=6)给予 $10~\mu L~$ 磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer saline, PBS)处理。断颈处理后进行动物解剖,收集并包埋大脑组织,- 80° C保存备用。之后对冷冻组织切片进行 HE 染色、油红 O 染色和免疫荧光染色实验,分析 $PM_{2.5}$ 对小鼠大脑病理改变、神经元水平及脂代谢的影响。

2.4 实验试剂配制

- (1) 冰冻切片固定液: 95%乙醇 25 mL、甲醇 50 mL、乙酸 25 mL 混合。
- (2) 1%盐酸乙醇: 75%酒精 99 mL, 浓盐酸 1 mL 混合。
- (3) 2%BSA: 100 mLPBS 中加入 2 g BSA。
- (4) 1×PBS 缓冲液: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.58 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, 定容至 1000 mL, 分装保存于 4℃。
- (5)DAPI 工作液: 将 DAPI 粉末溶于 ddH_2O 配制成 1 mg/mL DAPI 贮存液,锡纸包裹,-20℃长期保存; 取贮存液用 1×PBS 缓冲液稀释(1:1000),制成 DAPI 工作液,锡纸包裹,4℃保存。
- (6)油红 O 工作液: 0.5 g油红 O 粉末充分溶解于 100 mL 异丙醇,配制油红 O 原液;取 6 mL 原液,与 4 mL ddH₂O 混合,静置 10 min 后过滤,制成油红 O 工作液。

2.5 实验方法

2.5.1 冰冻切片制备

从-80°C超低温冰箱中取出脑组织样品后,置于冷冻组织切片机中,切片机冰冻箱内温度提前 2h 预冷至-30°C。用 OCT 包埋剂将组织固定到样品托中心位置,待包埋剂由透明转为发白凝固后,将样品托固定到样品台固定器上。调节刀片和组织块之间的距离,进行修片。当大脑组织修至切面整齐,且可连续切出完整对称的组织切片时,将切片厚度调整为 10 μm,去除前几张切片后即开始贴片。贴片后置于-80°C冰箱中,在染色时提前取出自然晾干,待载玻片上无水汽时便可染色。

- 2.5.2 HE 染色检测海马、皮质细胞组织学改变
- (1) 取贴有脑组织切片的载玻片自然晾干,浸入冰冻切片固定液中;
- (2) 水洗 1 s:
- (3) 用一次性滴管吸取苏木精染液滴于切片上,染液应全部覆盖组织,染色 1 min;
- (4) 浸入 1%盐酸乙醇 1 s;
- (5) 流水冲洗 30 s;
- (6) 浸入 95% 乙醇 1 s;
- (7) 浸入伊红染液中 3 s;
- (8) 稍水洗 1 s;
- (9) 按顺序浸入 80%、95%、无水乙醇各连续 2 次,每次 1 s;
- (10) 稍水洗 1 s;
- (11) 干燥后,滴加中性树胶,封片,镜检。
- 2.5.3 免疫荧光染色检测海马、皮质神经元相关蛋白表达水平
- (1) 取贴有脑组织冰冻切片的载玻片室温放置 30 min 以上;
- (2) 用 1×PBS 缓冲液清洗组织 3 次,每次 5 min;



- (3) 用免疫组化笔圈出组织范围;
- (4) 滴加 2% BSA, 湿盒中室温封闭 1 h:
- (5) 解育一抗: 吸取 Tuj+ChAT 混合抗体 (1:1000, 1:200) 足量滴于切片上,湿盒中4℃解育过夜;
 - (6) 1×PBS 缓冲液清洗组织 3 次,每次 5 min;
- (7) 孵育二抗: 吸取荧光二抗(1:1000) 足量滴于切片上,置于湿盒中,室温下避光 孵育 1h:
 - (8) 1×PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;
 - (9) DAPI 工作液染色 30 s;
 - (10) 1×PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;
 - (11) 干燥后,滴加抗淬灭剂,封片,激光共聚焦显微镜下观察。
 - 2.5.4 油红 O 染色检测海马、皮质组织脂滴水平
 - (1) 取贴有脑组织切片的载玻片自然晾干,滴加油红 O 工作液,室温下反应 10 min;
 - (2) 流水冲洗约 3 min, 至背景干净;
 - (3) 吸取苏木精染液足量滴于切片上,室温下反应 3 min;
 - (4) 流水冲洗 30 s:
 - (5) 干燥后,使用甘油明胶封片,镜检。
 - 2.5.5 免疫荧光染色检测海马、皮质脂代谢相关蛋白表达水平

此处免疫荧光染色步骤与前一致,一抗分别为兔抗 SREBP-1 抗体 (1:200)、鼠抗 PPAR γ 抗体 (1:100)。

2.6 图像处理及统计学分析

染色结果采用 Image-Pro Plus 6.0 测量,数据进行归一化处理后进行下一步分析。所有数据使用 SPSS 22.0 软件进行处理,采用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计分析和作图,各组计量资料以平均值±标准误表示(X \pm SEM)。免疫荧光染色的结果,两组数据的分析使用两个独立的样本 t 检验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,***p<0.0001,具有统计学意义。



第三章 实验结果

3.1 PM_{2.5} 暴露导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质损伤

3.1.1 组织学改变

将对照组和 $PM_{2.5}$ 滴鼻暴露组小鼠处理 2 个月后,处死小鼠,取出小鼠大脑组织制成冰冻切片。对小鼠大脑组织冰冻切片进行 HE 染色,结果如图 1 所示,对照组小鼠海马、皮质结构清晰完整,细胞密集,排列整齐,胞浆丰富,淡染;而与对照组相比较, $PM_{2.5}$ 处理组神经元胞体缩小,排列松散,胞浆浓缩,深染,表现为炎性改变。

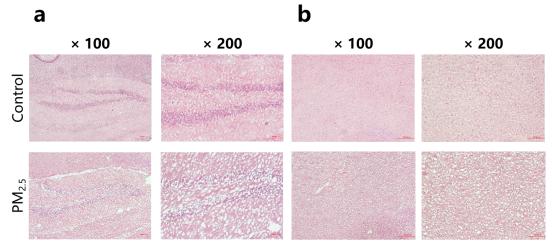


图 1 PM_{2.5} 导致 C57BL/6J 小鼠的海马、皮质组织病理水平改变。(a)小鼠脑组织海马 HE 染色; (b)小鼠脑组织皮质 HE 染色。

3.1.2 相关神经元蛋白表达情况

使用免疫荧光染色的方法,分别检测对照组和 PM_{2.5} 暴露组小鼠的海马、皮质区相关神经元蛋白表达变化。选择 Tuj 和 ChAT 作为混合一抗,其中 ChAT 对应红色荧光二抗,Tuj 对应绿色荧光二抗,染色结果如图 2a、b 所示,Tuj 阳性区域均与 DAPI 阳性细胞核分布一致,表明此处细胞大部分为神经元。染色结果采用 Image-Pro Plus 6.0 测量,对数据进行归一化处理后进行下一步分析。表 1、2 分别展示了在小鼠大脑的海马、皮层区,不同处理组中目的蛋白的相对表达水平以及两者的比值。

AA = AA MINE A MANUELL SENDENCE HAS LINEA AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN			
组别	Tuj	ChAT	ChAT/Tuj
对照组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07
PM _{2.5} 处理组	0.46 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.92 ± 0.02

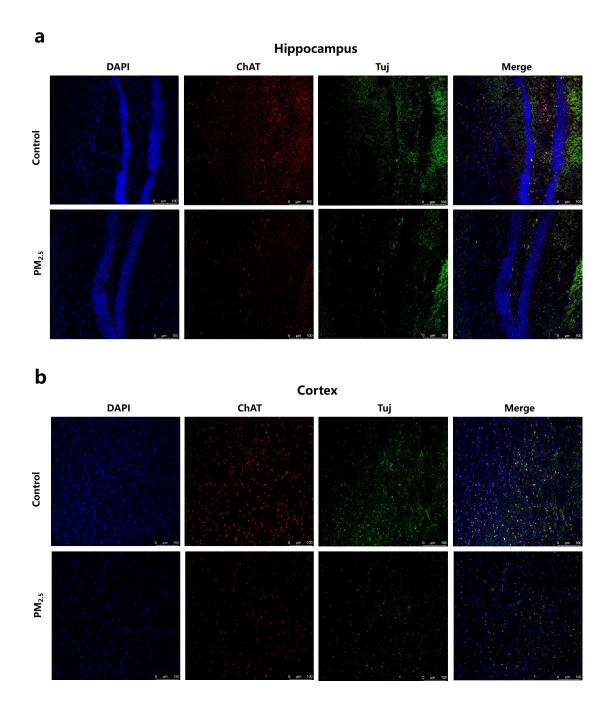
表 1 对照组与暴露组神经元蛋白的相对表达水平(海马)

表 2 对照组与暴露组神经元蛋白的相对表达水平(皮质)

组别	Tuj	ChAT	ChAT/Tuj
对照组	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.10
PM _{2.5} 处理组	0.86 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.72 ± 0.03



图 2c、d 表明,相对于对照组, $PM_{2.5}$ 暴露组小鼠海马中神经元标志物 Tuj 蛋白相对表达量 (0.46 ± 0.01) 显著降低 (p<0.0001),而在皮质中 (0.86 ± 0.05) 未见显著差异;而 $PM_{2.5}$ 暴露组的胆碱能神经元 ChAT 在海马 (0.43 ± 0.01) (p<0.0001) 和皮质 (0.62 ± 0.05) (p<0.01) 的蛋白相对表达水平均低于对照组。图 2e 显示,在小鼠海马区,ChAT/Tuj 在两组未表现出显著差异,而在皮质, $PM_{2.5}$ 处理组 ChAT/Tuj (0.72 ± 0.03) 水平显著降低 (p<0.05)。



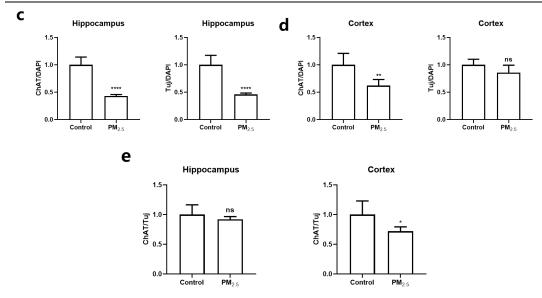


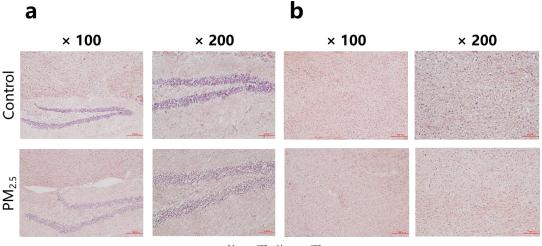
图 2 $PM_{2.5}$ 导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质中 Tju、CHAT 神经元蛋白表达水平发生变化。 (a,b)对照组、 $PM_{2.5}$ 处理组小鼠脑组织均进行 ChAT、Tuj、DAPI 免疫荧光染色 (×200); (c,d) 小鼠脑组织海马、皮质中 ChAT、Tuj 阳性结果分别与 DAPI 阳性结果显微镜下计数之比; (e)小鼠脑组织海马、皮质中 ChAT 阳性结果与 Tuj 阳性结果显微镜下计数之比。****p < 0.0001,**p < 0.01,*p < 0.05。

3.2 PM_{2.5} 暴露导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质区脂质改变

3.2.1 脂滴水平改变

脂滴是一种高度活跃的细胞器,其广泛存在于各种真核细胞的胞浆之中,脂滴的合成主要源于自身的从头合成途径。油红 O 是脂溶性染料,在脂肪内能高度溶解,可以特异性地使组织内核心为中性脂肪的脂滴着色。本次实验选取大脑冰冻切片组织进行油红 O 染色,以检测 PM_{2.5} 暴露对小鼠大脑海马、皮质区脂滴水平的影响,结果见图 3。

由图 3a,b 可见,小鼠大脑组织内脂滴被油红 O 染为橘红色,而细胞核被苏木精染色后呈蓝紫色。使用 Image-Pro Plus 6.0 分析各视野脂滴面积,采用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计分析和作图,结果显示(图 3c),与对照组相比, $PM_{2.5}$ 暴露组小鼠大脑海马区脂滴积累显著增多(p<0.05),在皮质区也出现相同趋势(p<0.05)。



第 9 页 共 21 页



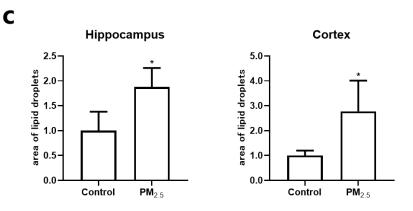


图 3 $PM_{2.5}$ 导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质区中脂滴积累水平变化。(a,b)对照组、 $PM_{2.5}$ 处理组小鼠大脑组织均进行油红 O 染色 (×200); (c)小鼠海马、皮质组织中脂滴面积。*p < 0.05。

3.2.2 脂代谢相关蛋白表达情况

大脑脂代谢由多种因子调节,形成较为复杂的调控网络。取小鼠大脑组织冰冻切片,采用免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜技术,检测脂代谢调节因子 SREBP-1、PPARγ蛋白的表达情况,通过视觉计数及荧光密度测定法进行相对定量分析。表 3、4 分别展示了在小鼠大脑的海马、皮层区,不同处理组中目的蛋白的相对表达水平。

免疫荧光染色结果显示, $PM_{2.5}$ 暴露组 C57BL/6J 小鼠大脑海马中 SREBP-1 蛋白分布较为密集,皮质分布表现出更明显的密集程度(图 4a)。用 Image-Pro Plus 6.0 测量发现,与对照组相比, $PM_{2.5}$ 组海马、皮质 SREBP-1 蛋白表达水平均明显升高 (p<0.05; p<0.01) (图 4b)。与对照组相比, $PM_{2.5}$ 暴露组小鼠的大脑海马、皮质区中 PPARγ蛋白分布较稀疏;使用 Image-Pro Plus 软件进行免疫荧光密度半定量分析,分别计算两组的平均光密度(mean optical density, MOD)。结果显示,暴露于 $PM_{2.5}$ 的小鼠海马、皮质中 PPARγ的 MOD 显著降低(p<0.01; p<0.01),表明 PPARγ蛋白呈减少的趋势。(图 4c,d)

表 3 对照组与暴露组 SREBP-1 的蛋白相对表达水平

组别	海马	皮质
对照组	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.20
PM _{2.5} 处理组	1.47 ± 0.12	1.93 ± 0.08

表 4 对照组与暴露组 PPARy的蛋白相对表达水平

组别	海马	皮质
对照组	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.14
PM _{2.5} 处理组	0.42 ± 0.05	0.29 ± 0.10



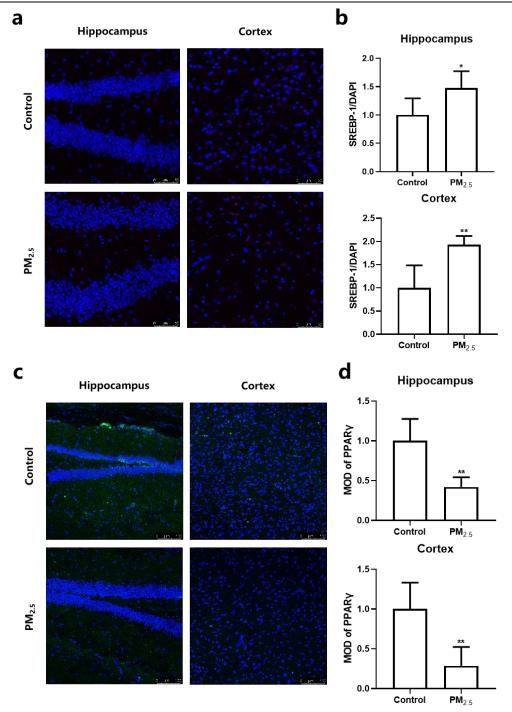


图 4 PM_{2.5} 导致 C57BL/6J 小鼠海马、皮质组织中,脂代谢调节通路相关蛋白相对表达水平变化。(a)对照组、PM_{2.5} 处理组小鼠大脑组织的 SREBP-1 免疫荧光染色结果(×400);(b) 小鼠海马、皮质区中 SREBP-1 蛋白的相对表达水平;(c) 对照组、PM_{2.5} 处理组小鼠大脑组织的 PPARγ免疫荧光染色结果(×200);(d) 小鼠海马、皮质区中 PPARγ蛋白的相对表达水平。**p < 0.01,*p < 0.05。



第四章 讨论

4.1 PM_{2.5} 对小鼠大脑病理的影响

近年来,PM_{2.5} 被发现与神经系统的不良影响相关。PM_{2.5} 是常见的室内外污染物,流行病学研究表明,长期接触 PM_{2.5} 与认知能力下降和大脑结构改变有关^[39,40]。HE 染色通过使细胞核、细胞浆着色,清晰呈现整个细胞组织的形态。对两组分别进行 HE 染色后,在光学显微镜下观察,与对照组清晰紧密的细胞排列结构相比,暴露于 PM_{2.5} 的小鼠大脑海马区齿状回细胞排列疏松无序,海马、皮质区神经元形态均发生改变,表现为明显的脑组织损伤。Liu^[41]等将小鼠同时暴露于 PM_{2.5} 和甲醛一周,调查脑损伤的病理特征发现小鼠海马区锥体细胞疏松无序,细胞形态肿胀变形,在皮质区亦发现病理变化;有研究^[7]对小鼠进行每7天气管内注射一次 20 mg/kg PM_{2.5} (10 ml/kg·体重)的处理,分别持续3个月、6个月、12个月,发现随着 PM_{2.5} 暴露时间的延长,逐步出现细胞缩小、边缘不清、胞浆空泡化、核固缩,以及神经元坏死等皮层组织病理学变化。这些研究均表明 PM_{2.5} 暴露可造成脑损伤,而我们的研究结果与之相一致。一些流行病学和毒理学研究证实,空气污染引起的脑血脑屏障、海马、嗅球和皮质等区域的脑组织损伤,与 AD 的病理表现相似^[42]。而 PM_{2.5} 和甲醛共暴露造成的脑组织损伤是神经退行性疾病常见的病理现象,可能影响神经信号传递和记忆形成,最终导致认知功能下降^[43]。

神经元的平衡发育对神经系统正常功能至关重要,不同功能的神经元分化发育异常均可能导致神经传导回路被破坏,如胆碱能神经元的功能减退与 AD、PD等神经障碍性疾病有关联。多项人类研究表明,空气污染严重的环境与认知功能下降[44]以及 AD-PD 样神经病理表现[45]相关。本次实验研究结果显示,暴露于 PM2.5 的小鼠海马、皮层区胆碱能神经元表面阳性标志物 ChAT 的表达水平呈显著下降的趋势,说明 PM2.5 负向调控胆碱能神经元的发生,提示可能存在胆碱能神经元的功能下降。在海马区,一般神经元标志物 Tuj 的表达情况与ChAT 一致。PM2.5 暴露组的小鼠海马中神经元标志物 Tuj 表达少于对照组,可能提示着对神经元发生发育的抑制与更多的神经元凋亡;而在小鼠大脑皮质中,PM2.5 组的 Tuj 表达与对照组无明显差异。研究们采用免疫组化分析验证 PM2.5 处理后脑组织细胞凋亡情况,发现随着 PM2.5 暴露时间的延长,导致神经元凋亡的因子过表达。一项体外研究表明,暴露于 PM2.5 后,海马体比嗅球、纹状体或大脑皮层表现出更明显的毒性神经反应[30]。另外,各种功能神经元在大脑中的平衡发育对神经系统有重要意义,PM2.5 暴露使得小鼠大脑皮质各种分化神经元中胆碱能神经元比例下降。特殊功能神经元的异常占比提示 PM2.5 可以对神经系统造成损伤,对其功能造成影响。

本研究中 HE 染色实验表明, $PM_{2.5}$ 暴露可以使小鼠大脑组织发生病理改变,多项研究 均将组织病理改变与神经退行性疾病 AD 相联系。大脑的总神经元以及各种类型的神经元的 表达水平的下降也常作为某些神经退行性疾病的一种标志。大量的研究已经证明 AD 的发生与胆碱能神经元损害紧密联系,大脑的胆碱能神经递质减少和胆碱能神经元损伤缺失均为 AD 的病理表现,而在 AD 模型小鼠中,乙酰胆碱转移酶 ChAT 表达降低[46],本次免疫荧光染色也发现类似结果。然而,本次实验中,皮质区总神经元的表达水平未见显著变化,且仅 检测了单一功能神经元,因此, $PM_{2.5}$ 造成的脑损害具体机制仍需更多实验从多方面共同阐明。



4.2 PM_{2.5} 对小鼠大脑脂代谢的影响

大脑的脂质组成与其他器官的脂质组成有很大差异,一般来说,中枢神经系统被认为在较大程度上是自主进行脂质代谢的,因为血脑屏障屏蔽了循环中的脂质。脂滴是一种动态的细胞器,从内质网膜中出现,作为甘油三酯和胆固醇的存储场所。在生理条件下,细胞将中性脂质储存于脂滴中,以防止脂毒性物质在细胞中异常积累。当能量来源不足时,细胞可以利用脂滴中的脂质供能,以维持能量和氧化还原的稳态。此外,脂滴还可以提供信号传导介质,参与调控各种细胞生物学过程。在脑细胞,大量脂质主要用于构成细胞膜结构,仅有较少储存在脂滴中。本研究通过对小鼠大脑冰冻切片进行油红 O 染色,发现暴露于 PM2.5 可以诱导海马、皮质区出现不同程度的脂质积累,对大脑脂代谢产生影响。正常成年鼠脑中少见神经元内堆积脂滴,但在神经退行性疾病亨廷顿病模型大鼠的皮层神经元中已明确检测到有脂滴存在[47]。另外,研究人员用油红 O 染色法观察衰老的小鼠大脑中脂滴的分布及形态,发现在脑膜、皮质、海马中均存在脂滴堆积的细胞,且这种细胞的密度随年龄增加而升高[48]。已有研究表明,在生理性衰老和神经退行性病变的脑细胞中,脂滴数量明显增多,因此脂滴积累这一内稳态失衡可以对大脑功能产生影响。

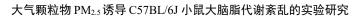
氧化应激已被证明是 $PM_{2.5}$ 致机体慢性受损的主要机制,会导致 ROS 积累。有研究表明,脂滴的增多与由 ROS 诱发的过氧化脂质蓄积有较大联系^[49]。神经元内 ROS 的升高促使更多的脂肪酸向胶质细胞转运,通过诱导胶质细胞中脂滴的堆积,进而缓解神经元的脂毒性 ^[50]。衰老大脑中的神经元通过向星形胶质细胞转运过氧化脂质,以维持神经元脂质稳态,同时诱导脂滴积累,进而发挥抗氧化的神经保护作用。然而,在氧化应激的条件下,若过氧化脂质持续积累至超出脂滴的储存能力时,脂毒性物质的增多会使星形胶质细胞分泌 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 等炎症因子,引起细胞活力下降乃至细胞死亡^[51],此时脂滴的抗氧化作用以及神经元和胶质细胞之间的代谢耦合将不足以阻止神经退行性病变的进程^[52]。

因此,我们通过油红 O 染色实验发现脂质积累,表明 $PM_{2.5}$ 暴露引起的导致大脑异常改变,如神经退行性病变,与脂质水平改变有极大关联。

既往研究报道,小鼠暴露于高浓度 $PM_{2.5}$ (平均浓度为 $101.5 \mu g/m^3$) 24 周后,血清和肝脏中甘油三酯和总胆固醇积累,可能是 $PM_{2.5}$ 暴露导致脂质代谢相关基因表达改变所造成[53]。本次实验通过免疫荧光染色实验,检测脂代谢相关基因 SREBP-1 与 PPARy的蛋白表达水平。

SREBP-1 是细胞脂质代谢的关键转录调控因子,与肝脏类似,大脑的 SREBP-1 可以调控脂肪从头生成,并参与维持脑内脂肪酸稳态。研究^[50]发现,ROS 水平的升高可以诱导 SREBP 蛋白的激活,进而提高神经元脂质合成和胶质细胞中脂滴的形成。脂滴的积累本身不足以促进神经退行性疾病的发展进程,而 ROS 的存在使得这些脂滴通过提高脂质过氧化水平促进神经退行性疾病的发展。已有研究表明,PM_{2.5} 可以导致肝脏氧化应激,表现为炎症、肝脏脂质代谢紊乱和脂肪变性的的特征^[22]。我们的实验结果显示,SREBP-1 在海马、皮质区表达增加,表明 PM_{2.5} 暴露引起氧化应激,上调 SREBP-1 的表达,增加脂质合成和脂滴形成,促使神经退行性疾病的发生。

脂质代谢过程受多种转录因子的调控,而 PPARs 是其中研究最多的一类转录因子。 PPARs 在人类和小鼠的研究中已充分被证明是代谢的主要调节因子^[54],PPARs 在体内作为脂肪感受器,局部改变相关基因的表达以调节脂质代谢。脂质分子一般通过被动扩散穿过细胞膜,而当组织中脂肪酸利用度较高或沉积时,细胞需要增加特异性转运载体的活性以增加脂肪酸的摄取。PPARγ通过控制脂肪酸转运酶、激活脂肪酸转运蛋白的表达,以促进脂肪酸与脂蛋白的分离^[55],以及脂肪酸和胆固醇的吸收^[56]。本次实验结果发现,暴露于 PM_{2.5} 的小鼠大脑中 PPARγ表达减少,因此可能导致细胞摄取脂肪酸受阻,引起脂肪酸沉积等脂代谢紊乱。





另外,PPARs 在中枢神经系统中的作用不仅涉及脂质代谢,同时也被认为与神经退行性变有关[57,58]。对 AD 患者尸检发现,患者大脑中 PPARy表达水平减少,与相关应答元件的结合能力退化;细胞实验发现,PPARy可以通过抑制促炎基因的表达,从而介导抗炎作用[59]。而抑制 PPARy表达可增加 A β 水平,进而导致神经元功能紊乱和死亡,同时造成 CNS 炎性反应,最终诱发神经元凋亡[59]。PM $_2.5$ 导致机体慢性受损的主要机制为氧化应激和炎症反应,而大量研究表明,PPARs 在多种病理条件下具有抗炎作用,可以通过抑制 NF- κ b 活性来下调 TNF- α 、IL-1 β 和其他炎症介质的表达[60]。以上研究与我们的结果表明,PM $_2.5$ 暴露可以通过介导 PPARy表达的抑制引起大脑神经退行性病变的发生发展,其中致病机制与更高的炎症反应水平、细胞凋亡与脂代谢紊乱相关。



第五章 结论

HE 染色表明,两个月的 $PM_{2.5}$ 暴露对野生型 C57BL/6J 小鼠在大脑病理方面有一定程度的影响,可以引起大脑组织海马、皮质区组织形态学炎性改变。免疫荧光染色表明, $PM_{2.5}$ 暴露导致海马、皮质区胆碱能神经元表达水平显著下降,而总神经元表达水平仅在海马有显著性差异,胆碱能神经元在总神经元中的占比仅在皮质区显著下降。油红 O 染色表明,与对照组相比,两个月的 $PM_{2.5}$ 暴露使野生型 C57BL/6J 小鼠大脑海马、皮质区脂质积累显著增加。免疫荧光染色表明, $PM_{2.5}$ 暴露显著增加小鼠大脑海马与皮质区的 SREBP-1 蛋白表达水平,而抑制 PPARy的表达。



发表论文情况

1. Wang Jian*,Ma Tengfei*,Ma Ding*,**Li Huimin***,Hua Li*,He Qing,Deng Xiaobei. The Impact of Air Pollution on Neurodegenerative Diseases[J]. Therapeutic Drug Monitoring,2021,43(1). 2.**李慧敏***,王健,卢银忠,蔡雨阳,邓晓蓓.PM_(2.5)对中枢神经系统功能及脂质代谢紊乱的影响 [J].环境与职业医学,2020,37(10):1022-1029.



参考文献

[1] 生态环境部, 生态环境部发布 2020 年全国生态环境质量简况 [EB/OL],(2021-03-02),[2021-04-24],

http://www.mee.gov.cn/xxgk2018/xxgk/xxgk15/202103/t20210302 823100.html.

[2]SHOU Y, HUANG Y, ZHU X, et al. A review of the possible associations between ambient PM2.5 exposures and the development of Alzheimer's disease [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 174(344-352.

[3]MUHLFELD C, ROTHEN-RUTISHAUSER B, BLANK F, et al. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(5): L817-829.

[4]RIEDL M A. The effect of air pollution on asthma and allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2008, 8(2): 139-146.

[5]MILLS N L, DONALDSON K, HADOKE P W, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution [J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2009, 6(1): 36-44.

[6]LEE S H, LEE P H, LIANG H J, et al. Brain lipid profiles in the spontaneously hypertensive rat after subchronic real-world exposure to ambient fine particulate matter [J]. Sci Total Environ, 2019, 135603

[7]ZHANG Q, LI Q, MA J, et al. PM2.5 impairs neurobehavior by oxidative stress and myelin sheaths injury of brain in the rat [J]. Environ Pollut, 2018, 242(Pt A): 994-1001.

[8]SERHAN C N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology [J]. Nature, 2014, 510(7503): 92-101.

[9]HUNTER M, DEMARAIS N J, FAULL R L M, et al. Layer-specific lipid signatures in the human subventricular zone demonstrated by imaging mass spectrometry [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2551.

[10]DAVLETOV B, MONTECUCCO C. Lipid function at synapses [J]. Curr Opin Neurobiol, 2010, 20(5): 543-549.

[11]LUKIW W J, CUI J G, MARCHESELLI V L, et al. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2774-2783.

[12]ABBOTT S K, JENNER A M, SPIRO A S, et al. Fatty acid composition of the anterior cingulate cortex indicates a high susceptibility to lipid peroxidation in Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2015, 5(1): 175-185.

[13]YU J T, TAN L, HARDY J. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update [J]. Annu Rev Neurosci, 2014, 37(79-100.

[14]TKACHEV A, STEPANOVA V, ZHANG L, et al. Differences in lipidome and metabolome organization of prefrontal cortex among human populations [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18348.

[15]李政灏, 鲁凤凤, 邵麒, et al. 髓鞘脂质的代谢与功能研究进展 [J]. 生理学报, 2017, 69(06): 817-829.

[16]ANDO S, TANAKA Y, TOYODA Y, et al. Turnover of myelin lipids in aging brain [J]. Neurochemical research, 2003, 28(1): 5-13.

[17]GONZALEZ-GARCIA I, FERNO J, DIEGUEZ C, et al. Hypothalamic Lipids: Key



Regulators of Whole Body Energy Balance [J]. Neuroendocrinology, 2017, 104(4): 398-411.

[18]KOSICEK M, HECIMOVIC S. Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers [J]. International journal of molecular sciences, 2013, 14(1): 1310-1322.

[19]TAN H H, FIEL M I, SUN Q, et al. Kupffer cell activation by ambient air particulate matter exposure may exacerbate non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Immunotoxicol, 2009, 6(4): 266-275.

[20]ZHENG Z, XU X, ZHANG X, et al. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model [J]. J Hepatol, 2013, 58(1): 148-154.

[21]KIM J W, PARK S, LIM C W, et al. The role of air pollutants in initiating liver disease [J]. Toxicol Res, 2014, 30(2): 65-70.

[22]DING S, YUAN C, SI B, et al. Combined effects of ambient particulate matter exposure and a high-fat diet on oxidative stress and steatohepatitis in mice [J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0214680.

[23]XU M X, GE C X, QIN Y T, et al. Prolonged PM2.5 exposure elevates risk of oxidative stress-driven nonalcoholic fatty liver disease by triggering increase of dyslipidemia [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130(542-556.

[24]YAN R, KU T, YUE H, et al. PM2.5 exposure induces age-dependent hepatic lipid metabolism disorder in female mice [J]. J Environ Sci (China), 2020, 89(227-237.

[25]ZHANG T, ZHENG Y, GAO Y, et al. Exposure to PM(2.5) affects blood lipid levels in asthmatic rats through notch signaling pathway [J]. Lipids Health Dis, 2019, 18(1): 160.

[26]MARTIN L D, KRUNKOSKY T M, DYE J A, et al. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates [J]. Environ Health Perspect, 1997, 105 Suppl 5(Suppl 5): 1301-1307.

[27]GE C X, QIN Y T, LOU D S, et al. iRhom2 deficiency relieves TNF-α associated hepatic dyslipidemia in long-term PM2.5-exposed mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(4): 1402-1409.

[28] WASCHEK J A. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(3): 512-523.

[29]刘颖, 张洁, 卞晶晶, et al. 大气颗粒物暴露和高脂高糖饮食对雄性大鼠学习记忆功能的影响 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35(05): 406-410.

[30]FAGUNDES L S, FLECK ADA S, ZANCHI A C, et al. Direct contact with particulate matter increases oxidative stress in different brain structures [J]. Inhal Toxicol, 2015, 27(10): 462-467.

[31]王婷婷 郑,李文燕,张红霞,李锋杰,于丽. 母源性 PM_(2.5)暴露致子代鼠大脑皮层神经炎症与星形胶质细胞和小胶质细胞激活 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2018, 27(04): 313-320.

[32]AJMANI G S, SUH H H, PINTO J M. Effects of Ambient Air Pollution Exposure on Olfaction: A Review [J]. Environ Health Perspect, 2016, 124(11): 1683-1693.

[33]BOYES W K, CHEN R, CHEN C, et al. The neurotoxic potential of engineered nanomaterials [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(4): 902-910.

[34]BACCARELLI A, WRIGHT R O, BOLLATI V, et al. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(7): 572-578.

[35]BELINSKY S A, SNOW S S, NIKULA K J, et al. Aberrant CpG island methylation of the p16(INK4a) and estrogen receptor genes in rat lung tumors induced by particulate carcinogens [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(2): 335-339.

[36]WRIGHT R O, BACCARELLI A. Metals and neurotoxicology [J]. J Nutr, 2007, 137(12):



2809-2813.

[37]MADRIGANO J, BACCARELLI A, MITTLEMAN M A, et al. Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men [J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(7): 977-982.

[38]李奔. 煤烟型大气污染物(SO2 和 PM2.5)诱导神经损伤的机制研究 [D]. 山西大学, 2018.

[39]AILSHIRE J A, CRIMMINS E M. Fine Particulate Matter Air Pollution and Cognitive Function Among Older US Adults [J]. Am J Epidemiol, 2014, 180(4): 359-366.

[40]CHEN J C, WANG X, WELLENIUS G A, et al. Ambient air pollution and neurotoxicity on brain structure: Evidence from women's health initiative memory study [J]. Ann Neurol, 2015, 78(3): 466-476.

[41]LIU X D, ZHANG Y C, YANG X. Vitamin E reduces the extent of mouse brain damage induced by combined exposure to formaldehyde and PM2.5 [J]. Ecotox Environ Safe, 2019, 172(33-39.

[42]MOULTON P V, YANG W. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease [J]. J Environ Public Health, 2012, 2012(472751.

[43]LIU X D, ZHANG Y C, LUO C, et al. At seeming safe concentrations, synergistic effects of PM2.5 and formaldehyde co-exposure induces Alzheimer-like changes in mouse brain [J]. Oncotarget, 2017, 8(58): 98567-98579.

[44]CALDERON-GARCIDUENAS L, MORA-TISCARENO A, ONTIVEROS E, et al. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs [J]. Brain Cogn, 2008, 68(2): 117-127.

[45]CALDERON-GARCIDUENAS L, REED W, MARONPOT R R, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution [J]. Toxicol Pathol, 2004, 32(6): 650-658.

[46]LI Q, CHEN M, LIU H M, et al. Expression of APP, BACE1, AChE and ChAT in an AD model in rats and the effect of donepezil hydrochloride treatment [J]. Mol Med Rep, 2012, 6(6): 1450-1454.

[47]SAVAGE M J, GOLDBERG D J, SCHACHER S. Absolute specificity for retrograde fast axonal transport displayed by lipid droplets originating in the axon of an identified Aplysia neuron in vitro [J]. Brain Res, 1987, 406(1-2): 215-223.

[48]SHIMABUKURO M K, LANGHI L G, CORDEIRO I, et al. Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes [J]. Sci Rep, 2016, 6(23795.

[49]LEVCHENKO S M, KUZMIN A N, OHULCHANSKYY T Y, et al. Near-Infrared Irradiation Affects Lipid Metabolism in Neuronal Cells, Inducing Lipid Droplets Formation [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(3): 1517-1523.

[50]LIU L, ZHANG K, SANDOVAL H, et al. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration [J]. Cell, 2015, 160(1-2): 177-190.

[51]GAO Y Q, LAYRITZ C, LEGUTKO B, et al. Disruption of Lipid Uptake in Astroglia Exacerbates Diet-Induced Obesity [J]. Diabetes, 2017, 66(10): 2555-2563.

[52]NAVE K A, TZVETANOVA I D, SCHIRMEIER S. Glial Cell Evolution: The Origins of a Lipid Store [J]. Cell Metab, 2017, 26(5): 701-702.

[53]GE C X, QIN Y T, LOU D S, et al. iRhom2 deficiency relieves TNF-alpha associated hepatic dyslipidemia in long-term PM2.5-exposed mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(4): 1402-1409.



[54]DESVERGNE B, WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism [J]. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649-688.

[55]SCHOONJANS K, PEINADO-ONSURBE J, LEFEBVRE A M, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene [J]. EMBO J, 1996, 15(19): 5336-5348.

[56]MARTIN G, SCHOONJANS K, LEFEBVRE A M, et al. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators [J]. J Biol Chem, 1997, 272(45): 28210-28217.

[57]CULLINGFORD T E, BHAKOO K, PEUCHEN S, et al. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system [J]. J Neurochem, 1998, 70(4): 1366-1375.

[58]HENEKA M T, LANDRETH G E. PPARs in the brain [J]. Biochimica et biophysica acta, 2007, 1771(8): 1031-1045.

[59]QUINTANILLA R A, UTRERAS E, CABEZAS-OPAZO F A. Role of PPAR gamma in the Differentiation and Function of Neurons [J]. Ppar Res, 2014, 2014(

[60]DUAN S Z, USHER M G, MORTENSEN R M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature [J]. Circ Res, 2008, 102(3): 283-294.



致谢

时光飞逝,五年的大学生活即将画上句号。在这五年里,我有幸遇到了许多温暖的人, 也逐渐从初入陌生城市的高中毕业生成长为视野更加开阔的本科毕业生。

在交大学习,是我人生中宝贵的经历,感谢学校提供良好的学习设施、先进的实验器材,以及无形的高层次科研平台和浓郁学习氛围。感谢公共卫生学院的所有老师在过去五年中的付出。

感谢我的毕业设计导师邓晓蓓老师。从实验的安排和学习,到实验的开展和论文的撰写,每一个过程都是邓老师认真设计,并且保持着温柔细心,严谨负责的态度,每一次都会耐心回答我的问题,同时予以帮助和鼓励。在邓老师的循循善诱之下,我掌握了许多实验技巧、熟悉了科研思路,发现问题和解决问题的能力也得到了提升。在将近两年的相处之中,邓老师的工作负责和对科研的热爱也深深鼓舞了我,这份积极的力量会一直推动我前行。感谢华丽老师,王健、马腾飞、马丁同学在实验技术方面对我的指导和帮助。

感谢我们的大创导师蔡泳老师,在百忙之中抽出时间带领我们的团队前行,为课题的顺利开展提供了必不可少的能量。感谢我加入的大创小组和社会实践小组,从课题构思、课题 开展到最后的结题,大家分工明确,都为着顺利完成而共同努力。

最后,感谢我的母亲和父亲,在我的人生道路上支持着我,让我有力量一往无前。感谢身边最亲密的人们,倾听我、陪伴我,为我排忧解难,赶走我的低落,带来阳光和正能量,和我分享喜悦,一起创造闪光的美好回忆。

毕业在即,又要面对不舍与离别,但我会一直期待更好的重逢。本科学习阶段走到终点,即将开启研究生科研的旅程,愿自己带着过去收获的爱与温暖,砥砺前行;愿大家平安顺意,有光明的未来。