

## · 基础研究 ·

## 维生素 C 对慢性铅暴露小鼠海马 NMDAR 表达的影响

王程强<sup>1</sup>, 彭小春<sup>2</sup>

(1. 桂林医学院公共卫生学院毒理学教研室, 广西桂林 541001; 2. 长江大学医学院机能学部, 湖北荆州 434203)

**摘要:**目的 探讨维生素 C 对慢性铅暴露小鼠海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)表达的影响。方法 将健康昆明系小鼠随机分为染铅组(从出生第 1 天起饲以醋酸铅水溶液 9.6 mmol/L)、维生素 C 给药组(从出生第 1 天起饲以醋酸铅 9.6 mmol/L 及维生素 C 7.5 mL/kg 水溶液)及对照组(饲以不含铅的饮用水), 每组 9 只。小鼠于出生 21 d 后断颈处死, 采静脉血检测血铅浓度, 并同时采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测其海马中 NMDAR 亚单位的表达水平。结果 维生素 C 给药组小鼠的血铅浓度显著低于染铅组, 但仍然高于对照组( $P < 0.01$ ), 维生素 C 给药组小鼠海马细胞的 NMDAR 亚单位  $\epsilon 1$  mRNA 表达水平较染铅组明显提高( $P < 0.01$ ), 而  $\epsilon 2$  mRNA 表达水平基本不变( $P > 0.05$ )。结论 维生素 C 可降低染铅小鼠的血铅浓度, 并可以影响小鼠海马 NMDAR 的表达水平, 对海马细胞具有一定保护作用。

**关键词:**铅中毒; 维生素 C; 受体, N-甲基-D-天冬氨酸; 海马; 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.028

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3597-02

## Effects of Vitamin C on expression of NMDAR in hippocampus of mice chronically exposed to lead

Wang Chengqiang<sup>1</sup>, Peng Xiaochun<sup>2</sup>

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China;

2. Department of Functional Sciences, Medical School of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434203, China)

**Abstract: Objective** To explore effects of Vitamin C on the expression of N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR) in hippocampus of mice chronically exposed to lead. **Methods** The healthy Kunming mice were randomly divided into lead-exposed group (fed with 9.6 mmol/L lead acetate in drinking water from the first day of birth), Vitamin C treatment group (fed with 9.6 mmol/L lead acetate and 7.5 mL/kg Vitamin C in drinking water from the first day of birth) and control group (fed with lead-free drinking water), with 9 mice in each. Mice were sacrificed by cervical dislocation on day 21 after birth. Venous blood was collected to detect the serum lead concentration and RT-PCR was employed to inspect the expression level of NMDAR subunit in their hippocampus.

**Results** Concentration of serum lead of mice in Vitamin C treatment group was significantly lower than that in lead-exposed group, but still higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). Compared with lead-exposed group, mRNA expression level of  $\epsilon 1$  subunit of NMDAR in hippocampus of mice in Vitamin C treatment group was markedly increased, while that of  $\epsilon 2$  subunit was basically unchanged ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Vitamin C can lower concentration of serum lead, affect the expression of NMDAR in hippocampus of lead-exposed mice, and exhibits protective effect on hippocampal cells.

**Key words:** lead poisoning; vitamin C; receptors, N-methyl-D-aspartate; hippocampus; mice

N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)在发育中的突触可塑性中发挥重要作用, 并与学习、记忆机制有关<sup>[1-2]</sup>。NMDAR 已被认定为铅引起的神经毒作用的主要靶点<sup>[3-5]</sup>, 早期铅暴露可以改变 NMDAR 亚单位的组成<sup>[6-7]</sup>, 进而影响海马细胞的发育与成熟, 这种对海马的持续性干扰作用可进一步的引起记忆功能的紊乱<sup>[8-9]</sup>。抗氧化剂是一类安全、无毒的物质, 它们在治疗铅中毒中发挥一定作用。本研究通过建立仔鼠低水平铅暴露模型, 同时应用维生素 C 进行治疗后, 检测小鼠血铅水平并采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法, 观察维生素 C 对仔鼠海马 NMDAR 亚单位  $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 2$  基因的表达水平, 以探讨抗氧化剂——维生素 C 对铅损伤海马细胞的修复机制。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 昆明系小白鼠购自中国医科大学实验动物中心。总 RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司,  $\epsilon 1$  和  $\epsilon 2$  引物购自南京金斯特生物公司。DY-1 型电泳仪、DYY-III 型电泳转移槽为北京六一仪器厂产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组与标本的收集** 昆明系小白鼠按每笼雄: 雌为 1: 2 自然交配, 随机分为对照组、染铅组、维生素 C 组给药组 3 组。每组 9 只, 共 27 只。染铅组小鼠从出生第 1 天起开始饲以 9.6 mmol/L 醋酸铅水溶液, 维生素 C 给药组在以相同浓度醋酸铅水溶液同时以 7.5 mL/kg 维生素 C 饲养, 对照组饲以不含铅的饮用水。于出生 21 d 后断颈处死, 以微量注射器经眼眶采静脉血 0.5~1.0 mL, 肝素抗凝; 同时分离脑海马。

**1.2.2 血铅测定** 按石墨原子吸收法测定血铅浓度。

**1.2.3 总 RNA 提取** 取标本 100 mg, 按 Invitrogen 试剂盒说明书操作提取总 RNA, 并将其沉淀溶于 20  $\mu$ L 无 DNA 酶/RNA 酶的灭菌水中。

**1.2.4 cDNA 合成及 PCR 反应** 按 Takara RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录反应, 总反应体积 10  $\mu$ L。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由南京金斯特生物公司合成,  $\epsilon 1$  上游引物: 5'-CCC ACC TAC TCA GGC CAC TT-3'; 下游引物: 5'-CCG ACT GTC CCT GGA GCA AT-3', 产物片段大小为 588 bp。  $\epsilon 2$  上游引物: 5'-CTC TCA GGT GGC AGG GCA AA-3'; 下游引物: 5'-GGG GTT GGA CTG GTT CCC TA-3',

产物片段大小为 670 bp。β-actin 上游引物:5'-GTG GGC CGG TGT AGG CAC CA-3',β-actin 下游引物:5'-GGT TGG CCT TAG GGT TCA GG-3',产物片段大小为 246 bp。循环条件为:94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,70 °C 40 s,72 °C 5 min,4 °C 1 h 结束<sup>[10-13]</sup>。

**1.2.5 PCR 产物的分析** 取 PCR 扩增后的产物 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪扫描成像,采用凝胶自动分析成像软件进行灰度值分析,采用 β-actin 灰度值为内对照,求出 ε1 和 ε2 mRNA 量的相对值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件,首先进行 One-Sample Kolmogorov-Smirnov test 检验方法,对 3 组独立样本进行正态性检验。接下来进行方差齐性检验与单因素方差分析,如  $P < 0.05$ ,则进一步利用 LSD 法,进行两两比较。

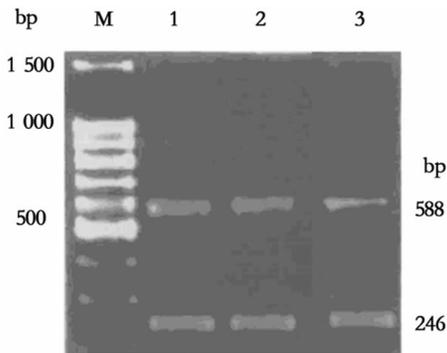
## 2 结果

**2.1 3 组小鼠血铅浓度比较** 于小鼠出生后 21 d 对血铅浓度进行测定,3 组独立样本呈现正态分布(表 1),经方差齐性检验, $P = 0.117$ ,故 3 组方差齐。方差分析得出  $F = 4\ 704.909$ , $P < 0.01$ 。故 3 组小鼠血铅浓度差异有统计学意义。

表 1 3 组小鼠血铅浓度比较

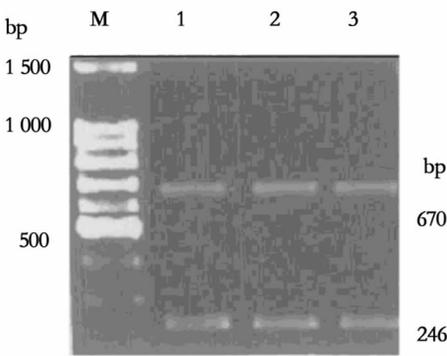
组别	n	血铅( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )	Z	P
对照组	9	12.41 ± 3.53	0.403	0.997
染铅组	9	459.56 ± 7.31*	0.445	0.989
维生素 C 给药组	9	297.05 ± 15.10*	0.862	0.447

\*:  $P < 0.01$ ,与对照组比较。



M: 标记物; 1: 对照组; 2: 维生素 C 给药组; 3: 染铅组。

图 1 3 组小鼠 NMDAR 亚单位 ε1 基因表达



M: 标记物; 1: 对照组; 2: 维生素 C 给药组; 3: 染铅组。

图 2 3 组小鼠 NMDAR 亚单位 ε2 基因表达

**2.2 3 组小鼠 NMDAR 亚单位 ε1、ε2 基因表达量比较** 3 组小鼠 NMDAR 亚单位 ε1、ε2 基因表达量见图 1、2。3 组独立样本呈现正态分布(表 2),经方差齐性检验, $P = 0.117$ ,故 3 组方差齐。方差分析得出  $F = 1\ 608.871$ , $P < 0.01$ ,故 3 组小鼠 ε1 基因表达量差异有统计学意义。慢性铅暴露对仔鼠 NMDAR 亚单位 ε2 基因表达的影响,3 组之间差异无统计学意义。

表 2 各组小鼠 ε1、ε2 基因表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ε1 基因表达量	Z	P	ε2 基因表达量
对照组	9	175.95 ± 4.06	0.415	0.995	148.56 ± 3.76
染铅组	9	90.20 ± 2.92*	0.418	0.995	146.97 ± 6.35
维生素 C 给药组	9	121.12 ± 1.87*	0.599	0.866	150.76 ± 3.57

\*:  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

## 3 讨论

NMDAR 是一种离子型谷氨酸受体,由其亚单位 NR1 和 NR2A-NR2D 结合构成。小鼠 NMDAR 受体包括 ζ1 和 ε1~4 共 5 个亚单位,其常见的组成形式是 ζ1/ε,皮质和海马主要表达 ε1 和 ε2。近年有文献报道皮质和海马的 ε1 与 ζ1 或 ε2 结合基因表达越高,空间学习、记忆能力越强<sup>[10-13]</sup>。

本研究在建立仔鼠低水平铅暴露模型的基础上,利用在动物饲料中添加维生素 C 进行处理,以观察维生素 C 预防小鼠铅中毒的效果。通过检测小鼠血铅水平发现,染铅组和维生素 C 给药组小鼠的血铅浓度明显高于对照组( $P < 0.01$ ),但是维生素 C 给药组小鼠的血铅浓度低于染铅组( $P < 0.01$ ),表明维生素 C 可以明显的影响染铅小鼠的血铅水平。说明补充大剂量维生素 C 可以缓解铅导致维生素 C 缺乏及其代谢紊乱,这与很多文献报道一致。

脑海马的 ε1 与 ζ1 或 ε2 结合基因表达与其空间学习、记忆能力呈密切相关性,本实验应用 RT-PCR 的方法观察维生素 C 对染铅小鼠海马 NMDAR 亚单位 ε1、ε2 mRNA 的表达水平,结果显示染铅 21 d 时,小鼠海马 NMDAR 亚单位 ε1 mRNA 表达量开始降低,维生素 C 给药组小鼠 NMDAR 亚单位 ε1 mRNA 表达量比对照组降低,但明显高于染铅组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

机体一旦发生了铅中毒,将铅完全从体内排除几乎是不可能的,若能使体内的低含量铅不会再对机体产生毒害作用就显得尤为重要。抗氧化剂是一类可以给出电子、中和自由基,而自身不会形成有害的物质,也不会发生连锁反应,通过清除自由基达到抗氧化目的的物质,其在铅中毒的治疗剂量下安全无毒,在治疗铅中毒中发挥一定作用。维生素 C 为体内一种强还原剂,其特异性反应可以还原其他物质而自身氧化成脱氢 L 抗坏血酸。抗坏血酸和脱氢 L 抗坏血酸是一种有效的氧化还原系统,即使是氧化型的脱氢 L 抗坏血酸仍具有维生素 C 的活性<sup>[14]</sup>。在给予抗氧化剂治疗铅中毒时,能迅速有效地降低体内铅蓄积含量,且对神经系统具有良好的效果同时还可以缓解维生素和必需微量元素的缺乏<sup>[15]</sup>。

本研究应用维生素 C 对染铅小鼠进行治疗,发现可以明显降低小鼠血铅水平并可以提高小鼠海马 NMDAR 亚单位 ε1 基因的表达水平,说明这种治疗方案在预防铅中毒中发挥一定作用,并初步阐明了铅损伤后学习、记忆功能的修复机制。

(下转第 3601 页)

用现代信息技术获得知识的要求更高。

#### 参考文献:

- [1] 卫生部,教育部,财政部,人事部,农业部.关于加强农村卫生人才培养和队伍建设的意见[EB/OL].(2003-01-07)[2011-01-10].[http://www.moh.gov.cn/sofpro/cms/previewjspfile/wsb/cms\\_000000000000000207\\_tpl.jsp?requestCode=31786&CategoryID=7375](http://www.moh.gov.cn/sofpro/cms/previewjspfile/wsb/cms_000000000000000207_tpl.jsp?requestCode=31786&CategoryID=7375).
- [2] 卫生部.农村卫生人员培训大纲指导意见[EB/OL].(2005-03-21)[2011-01-07].<http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohncwsgls/s3585/200804/31031.htm>.
- [3] 陈镜治,唐尧根,李拯民.乡镇卫生院院长培训手册[M].北京:科学出版社,2006:45-47.
- [4] 卫生部.乡镇卫生院卫生技术人员培训暂行规定[EB/OL].(2004-07-01)[2011-01-07].<http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/zwgkzt/pkjy/200804/20473.htm>.
- [5] 中共中央,国务院.关于进一步加强农村卫生工作的决定[EB/OL].(2002-10-19)[2011-01-08].<http://wenku.baidu.com/view/ea4aec28647d27284b7351c4.html>.
- [6] 国务院.关于农村卫生改革与发展的指导意见[EB/OL].(2001-05-24)[2011-01-08].[http://www.lawyeer.net/act/act\\_display.asp?rid=42073](http://www.lawyeer.net/act/act_display.asp?rid=42073).

- [7] 李兰屏.新型农村合作医疗制度下乡镇卫生院发展机遇[J].思茅师范高等专科学校学报,2008,24(5):138-140.
- [8] 中共中央,国务院.关于推进社会主义新农村建设的若干意见[EB/OL].(2005-12-31)[2011-01-08].<http://wenku.baidu.com/view/04e8e7f8aef8941ea76e05ea.html>.
- [9] 中共中央,国务院.关于深化医药卫生体制改革的意见[EB/OL].(2009-03-17)[2011-01-08].<http://wenku.baidu.com/view/f713b0c10c22590102029d10.html>.
- [10] 刘运国,王禄生.乡镇卫生管理教材[M].北京:北京协和医科大学出版社,2005:101.
- [11] 黄雅珠.关于加强乡镇卫生院管理的几点思考[J].宁德师专学报:自然科学版,2008,20(4):424-427.
- [12] 李显文,朱建华.现代乡镇卫生院管理[M].北京:中国科学出版社,2010:14.
- [13] 何蔚新,张三楫,靳丽彬.浅谈新形势下乡镇卫生院的建设与发展[J].中国初级卫生保健,2008,22(10):33.
- [14] 石金涛.现代人力资源开发与管理[M].上海:上海交通大学出版社,2004:85.
- [15] 中共中央,国务院.关于卫生改革与发展的决定[EB/OL].(1997-01-15)[2011-01-08].<http://baike.baidu.com/view/2872404.htm>.

(收稿日期:2011-04-15 修回日期:2011-07-28)

(上接第 3598 页)

#### 参考文献:

- [1] Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses[J]. Science, 2001, 294(5544):1030-1038.
- [2] Montgomery JM, Selcher JC, Hanson JE, et al. Dynamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state[J]. BMC Neurosci, 2005(6): 48.
- [3] 周红梅,赵文利,张雪,等.1 029 例 10 岁以下儿童血铅检测结果分析[J].重庆医学,2006,35(17):1582-1584.
- [4] 戚其平,杨艳伟,姚孝元,等.中国城市儿童血铅水平调查[J].中华流行病学杂志,2002,23(3):162.
- [5] 赵文利,孔祥英,刘力健.重庆市新生儿及其生母血铅测定及影响因素调查[J].重庆医学,2001,30(6):514.
- [6] 梁建成,汪春红,张妍.醋酸铅染毒小鼠 DNA 损伤及体内抗氧化酶变化[J].中国公共卫生,2006,22(4):457-458.
- [7] 赵正言,邵杰,竺智伟.铅的神经毒理机制研究进展[J].中国实用儿科杂志,2006,21(3):163-165.
- [8] 熊伟,赵英,万炜,等.铅暴露对大鼠大脑皮质和海马 NOS 的影响[J].南华大学学报:医学版,2007,35(3):131-133.
- [9] 范广勤,冯昶,黎玉,等.多种营养素对染铅大鼠海马 NOS 和 NO 影响[J].中国公共卫生,2007,23(10):1180-1182.

- [10] Gavazzo P, Gazzoli A, Mazzolini M, et al. Lead inhibition of NMDA channels in native and recombinant receptors [J]. Neuroreport, 2001, 12(14):3121-3125.
- [11] Toscano CD, Hashemzadeh-Gargari H, McGlothlan JL, et al. Developmental Pb<sup>2+</sup> exposure alters NMDAR subtypes and reduces CREB phosphorylation in the rat brain [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 139(2):217-226.
- [12] Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression[J]. Mol Psychiatry, 2000, 5(3):262-269.
- [13] Magnusson KR. Influence of diet restriction on NMDA receptor subunits and learning during aging[J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(4):613-627.
- [14] Flora SJ, Pande M, Mehta A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication[J]. Chem Biol Interact, 2003, 145(3):267-280.
- [15] Zhang W, Linden DJ. Long-term depression at the mossy fiber-deep cerebellar nucleus synapse [J]. J Neurosci, 2006, 26(26):6935-6944.

(收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-07-18)