

· 基础研究 ·

铅对小鼠学习记忆功能影响与突触囊泡蛋白相关

赵 奇, 王 艳, 武红娟, 陈 于[△]

(重庆医科大学公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生教研室 400016)

摘要:目的 探讨小鼠海马中突触囊泡蛋白与铅对小鼠学习记忆功能影响的相关性。方法 将雄性昆明小鼠 24 只, 随机平均分为两组, 对照组和铅染毒组, 对照组饲以蒸馏水, 铅染毒组饲以 2.4 mmol/L 的醋酸铅水溶液, 在暴露后 30 d, 进行 Morris 水迷宫实验以检测其逃逸潜伏期, 采用 Western blot 法检测海马中突触囊泡蛋白水平, 并采用 HE 切片方法观察处理前后小鼠海马脑区病理变化。结果 Morris 水迷宫结果显示铅暴露后 30 d 可导致小鼠逃逸潜伏期延长 ($P < 0.05$), 且暴露后 30 d 铅染毒组小鼠海马中突触囊泡蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$), 但脑组织 HE 切片显示铅暴露 30 d 后并未引起脑组织海马脑区病理学改变。结论 慢性铅暴露可导致小鼠学习记忆功能损伤, 且这种损伤可能与其海马中突触囊泡蛋白表达下降有关。

关键词:铅; Morris 水迷宫; 突触囊泡蛋白; 海马

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)11-1103-03

Lead-induced learning and memory changes in mice are linked to synaptophysin expression

Zhao Qi, Wang Yan, Wu Hongjuan, Chen Yu[△]

(Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effect of chronic lead contamination on the function of learning and memory in mice and the relevance with synaptophysin in hippocampus. **Methods** 24 mice were divided randomly into experimental group and control group. Mice in experimental group were fed with lead acetate at concentrations (2.4 mmol/L), and those in control group were fed with distilled water instead. After 30 days exposure, the escape latency was tested by Morris water maze, the expression levels of synaptophysin in hippocampus were detected by western blot, and the pathological change of hippocampus in mice was observed by HE staining after treated processing. **Results** 30 days after lead exposure, escape latency of mice extended ($P < 0.05$), and synaptophysin protein expression in hippocampus decreased significantly ($P < 0.05$) in experimental group, compared with control group. No histological alteration was observed in the brains intoxicated with lead exposure. **Conclusion** Chronic lead exposure can lead to learning and memory impairment in mice, and the damage may be related with the down-regulation of hippocampal synaptophysin protein expression.

Key words: lead; Morris water maze; synaptophysin; hippocampus

铅是广泛存在于生产及生活环境中的重金属元素, 长期接触铅能够造成机体多个系统损伤, 其中铅对中枢神经系统的毒性作用越来越被人们重视。有研究表明, 长期接触铅可导致严重的神经毒作用, 造成神经行为障碍和认知能力低下等^[1-2]。Morris 水迷宫实验是作为检测实验大鼠、小鼠空间学习记忆功能常用方法^[3], 海马脑区则是空间学习记忆功能的中枢^[4]。突触囊泡蛋白(Synaptophysin, Syn)是突触囊泡的一种特异性标志蛋白, 与胞吐作用密切相关^[5]。Syn 变化可间接反映体内突触的数量和分布情况, 与突触重建及认知过程密切相关, 其缺乏可导致学习记忆功能下降^[6]。Syn 在学习记忆过程中发挥重要作用, 并且其与铅所致学习记忆功能损伤的关系研究较少。本实验拟对海马区 Syn 表达与铅所致小鼠学习记忆功能损伤关系进行研究, 进而探讨铅的神经毒性作用相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 清洁级 8~9 周龄雄性昆明小鼠 24 只 [(购自大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心, 许可证编号: SCXK(渝)2007-0005)。动物饲养温度: (21±2)℃, 室内光照 12 h(光照时间 08:00 到 20:00), 动物进食标准基础饲料,

自由进水。适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分为两组, 对照组和铅染毒组, 每组 12 只。

1.2 主要试剂及仪器 醋酸铅 (Sigma, 美国) 纯度 99.99%, 突触囊泡蛋白单克隆抗体 (AB8049, Abcam, 美国), 驴抗小鼠荧光抗体 IRDye800CW (LI-COR, 美国), β -actin 抗体 (Sigma, 美国)。MT-200 型 Morris 水迷宫视频跟踪系统 (成都泰盟, 中国), 蛋白电泳系统 (Bio-Rad, 美国), Odyssey 红外荧光扫描成像系统 (LI-COR, 美国), DM6000B 型倒置光学显微镜及图像采集系统 (Leica, 德国)。

1.3 铅染毒实验 铅染毒组小鼠饲养饮水由醋酸铅溶于蒸馏水中配制, 醋酸铅浓度 2.4 mmol/L, 剂量参照文献^[7-9], 并经预实验确定; 对照组饮水则为蒸馏水。饲养过程中, 笼具、水瓶等所有用具均使用不含铅的制品。各组动物自由进食、饮水, 喂养 30 d 后对动物进行各项测试。

1.4 Morris 水迷宫实验 实验方法参照文献^[10]进行: 水池直径 120 cm, 池深 50 cm; 平台直径 10 cm, 位于水面下 1 cm。水池平分分为四个象限, 平台位于其中一象限正中位置, 实验开始后平台位置固定不变, 摄像头位于迷宫正中上方位置。迷宫

[△] 通讯作者, E-mail: lucychenyu2000@yahoo.com.cn.

内水温保持在 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$,池水加奶粉使之浑浊。水迷宫实验正式开始前 24 h,各组小鼠均放入迷宫内(无平台)自由游 10 次,每次 60 s,使之适应迷宫内环境。在铅暴露第 30 天,对照组和铅染毒组进行水迷宫定位航行实验。实验时,将小鼠面朝水迷宫池壁,随机从四个象限中的一个象限中点轻轻放入水迷宫。每次训练设定时限 60 s,若 60 s 内小鼠找到隐藏在水面下的平台,则让小鼠在平台上停留 30 s,并记录其找到隐藏平台的时间,即逃逸潜伏期;若 60 s 内小鼠未能找到平台,则将小鼠轻轻引导至平台上,并使之在平台上停留 30 s,逃逸潜伏期记为 60 s。同时系统会记录小鼠搜索平台的轨迹。一次训练结束后,将小鼠擦干后,放在取暖器旁休息,等待下一次训练,每次训练间隔 15 min,每只小鼠共训练 8 次。水迷宫实验结束后 24 h,每组随机取 9 只小鼠用水合氯醛麻醉,断头处死,取其海马组织,组织冻存于 -80°C 备用;另外 3 只小鼠则用于做脑组织切片。

1.5 海马区 HE 切片实验 将水迷宫实验结束后的两组中的小鼠各 3 只,参照文献[11]方法,取小鼠全脑做连续冠状切片,常规 HE 染色后显微镜下观察小鼠铅染毒后海马 CA1、CA3 和齿状回区神经元变化。

1.6 Western blot 实验 将冻存的组织加 RIPA 匀浆裂解后,提取海马组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,上样量 $60\ \mu\text{g}$,10% SDS-PAGE 电泳,转膜至 NC 膜,5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液封闭。突触囊泡蛋白单克隆抗体(1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜,驴抗小鼠荧光二抗(1:5000)室温孵育 1 h,洗膜,Odyssey 红外荧光扫描成像系统扫描条带,用 Odyssey 系统软件对目的条带荧光光密度进行分析。 β -actin 做内参,两组结果再行比较。

1.7 统计学处理 两组小鼠每次水迷宫逃逸潜伏期和 Western blot 实验结果,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验 (1)各组小鼠连续 8 次水迷宫实验逃逸潜伏期结果见表 1。结果显示对照组小鼠随训练次数的增加,其逃逸潜伏期逐渐缩短,即搜索到隐藏平台所用时间逐渐减少。铅染毒组小鼠学习记忆功能明显受损,表现为第 3 次($P<0.05$)、第 4 次至第 8 次($P<0.01$)水迷宫实验,铅染毒组小鼠逃逸潜伏期与对照组比较显著延长($P<0.05$)。(2)轨迹图(图 1)为第 8 次训练各组小鼠水迷宫轨迹。从轨迹图上看,对照组小鼠经过连续 8 次训练后,找寻平台的方向性明确,路径简单直接;铅染毒组小鼠搜索平台的轨迹与对照组比,目标性不明确,轨迹杂乱,经过训练虽然能够找到隐藏的平台,但其找寻平台的路径相对方向性不如对照组准确,无法快速有效搜寻到隐藏的平台。

表 1 两组小鼠逃逸潜伏期比较($n=12,\bar{x}\pm s$)

训练次数	逃逸潜伏期(s)	
	对照组	铅染毒组
第 1 次	60.00 \pm 0.00	60.00 \pm 0.00
第 2 次	47.92 \pm 11.27	55.67 \pm 5.92
第 3 次	46.59 \pm 14.79	51.09 \pm 11.45*
第 4 次	35.72 \pm 13.21	56.34 \pm 5.15#

续表 1 两组小鼠逃逸潜伏期比较($n=12,\bar{x}\pm s$)

训练次数	逃逸潜伏期(s)	
	对照组	铅染毒组
第 5 次	27.48 \pm 13.70	49.15 \pm 13.31#
第 6 次	32.70 \pm 10.80	44.33 \pm 12.62#
第 7 次	25.31 \pm 10.84	42.31 \pm 8.44#
第 8 次	26.09 \pm 8.56	37.44 \pm 11.62#

#: $P<0.01$,*: $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 Western blot 检测结果 与对照组比较,铅染毒组小鼠海马区中 Syn 表达水平显著降低($P<0.05$),见图 2。

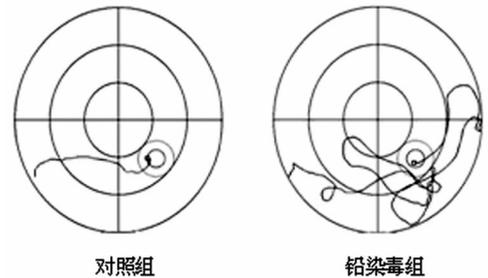


图 1 经过连续 8 次训练后各组小鼠水迷宫轨迹图

2.3 海马区神经元 HE 切片形态观察 结果显示,铅染毒组小鼠海马区较对照组无明显变化。对照组和铅染毒组海马神经元呈带状分布,排列整齐,CA1、CA3 区锥体细胞及齿状回区颗粒细胞形态均正常,核居中,大而圆,染为淡蓝色,核仁核膜清晰,核仁染为紫色,胞质红色且着色均匀,见图 3。

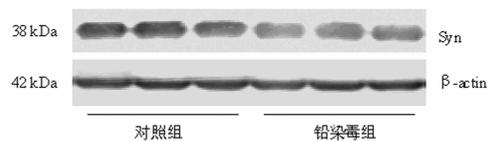


图 2 Western blot 检测 Syn 结果

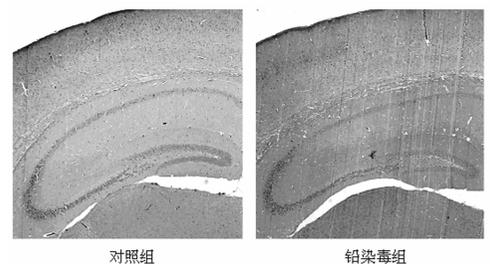


图 3 两组小鼠海马区 HE 切片结果($\times 50$)

3 讨论

现有研究认为铅直接的神经毒性主要是促进细胞凋亡、神经系统兴奋性中毒及对神经递质储存与释放的影响^[12-13]。而本研究结果提示 Syn 在铅导致的神经毒性机制中可能亦发挥重要作用。

本研究中,Morris 水迷宫实验结果显示铅染毒组小鼠逃逸潜伏期较对照组显著延长,表明慢性铅暴露可导致小鼠空间学习记忆功能损伤。由于海马是空间学习记忆重要脑区,其功能受到抑制时将会导致学习记忆功能下降^[14]。

有文献指出,大鼠长期饮用高铅水,铅可通过血-脑屏障

对大鼠大脑皮层和海马组织造成明显病理损伤,本实验中并未发现铅对小鼠海马造成明显病理损伤^[15],但 Morris 水迷宫却显示铅已经导致了小鼠学习记忆功能损伤,提示铅导致的学习记忆功能损伤可能并非是单纯由其导致的病理变化引起。

Syn 与突触囊泡的胞吐作用密切相关,其变化可间接反映体内突触的数量和分布情况,与认知过程及突触重建密切相关,Syn 的缺乏可导致学习记忆功能下降^[6]。Western blot 结果显示,铅染毒组小鼠海马中 Syn 表达较对照组显著降低。结合水迷宫实验和海马 HE 切片结果,提示铅染毒造成的小鼠学习记忆功能损伤,在其出现病理损伤前可能是由于铅导致小鼠海马区 Syn 表达水平降低造成。但是铅如何通过影响 Syn 表达进而引起铅染毒小鼠学习记忆功能损伤,仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨坦,丁玉琴,刘萍. 铅暴露对大鼠学习记忆功能和海马 CA1 区 LTP 的影响[J]. 医学信息,2008,21(6):872-875.
- [2] Chang W,Chen J,Wei QY,et al. Effects of Brn-3a protein and RNA expression in rat brain following low-level lead exposure during development on spatial learning and memory [J]. Toxicol Lett,2006,164(1):63-70.
- [3] 曲巍,王孝文,王金平. 鼠脑穹隆海马伞切断突触素动态变化及 Morris 水迷宫重复训练对其影响[J]. 解剖学研究报告,2009,31(6):414-419.
- [4] 田枫,齐晓旭,郑振辉. α -亚麻酸对大鼠学习记忆功能和海马神经元的影响[J]. 中国老年学杂志,2009,29(6):664-666.
- [5] Arthur CP,Stowell MH. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein[J]. Structure,2007,15(6):707-714.
- [6] Schmitt U,Tanimoto N,Seeliger M,et al. Detection of be-

havioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin[J]. Neuroscience,2009,162(2):234-243.

- [7] 高双,官慧芝,姜泓,等. PKC- γ 和 ERK 在慢性染铅小鼠脑皮质区的异常表达[J]. 中国医科大学学报,2008,37(5):627-640.
- [8] 彭博,吴哲,张朝东. 铅对小鼠大脑皮层神经元磷脂酰肌醇 3 激酶影响[J]. 中国公共卫生,2010,26(2):228-229.
- [9] 郝凤进,高双,袁莹,等. 慢性铅暴露对小鼠脑皮质区 ERK 蛋白表达的影响[J]. 贵阳医学院学报,2008,33(1):16-18.
- [10] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. Neurosci Methods,1984,11(1):47-60.
- [11] 刘剑,秦大莲,黄新武,等. 脑舒胶囊对阿尔茨海默病大鼠学习记忆力的改善及海马神经元的保护[J]. 中药药理与临床,2010,26(4):54-57.
- [12] Lidsky TI,Schneider JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates[J]. Brain,2003,126(1):5-19.
- [13] Verina T,Rohde CA,Guilarte TR. Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats [J]. Neuroscience,2007,145(3):1037-1047.
- [14] 许志强,张涛,张猛,等. proBDNF 对老龄鼠空间学习与记忆功能的影响[J]. 重庆医学,2008,37(7):683-685.
- [15] 蒋建军,贾庆华,刘春杰,等. 醋酸铅对小鼠星形胶质细胞的凋亡作用[J]. 工业卫生与职业病,2010,36(4):224-229.

(收稿日期:2011-11-21 修回日期:2011-12-29)

(上接第 1079 页)

- cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK[J]. Chin J Cancer,2010,29(7):641-648.
- [2] Thanendrarajan S,Nowak M,Abken H,et al. Combining cytokine-induced killer cells with vaccination in cancer immunotherapy: more than one plus one [J]. Leuk Res,2011,35(9):1136-1142.
- [3] Zhong R,Teng J,Han B,et al. Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Immunol Immunother,2011,60(10):1497-502.
- [4] 李菁媛,陈智超. DC-CIK 细胞治疗研究[J]. 临床血液学杂志,2008,21(2):168-170.
- [5] Su CY,Chou FH,Tsai KY,et al. The establishment of a standard operation procedure for psychiatric service after an earthquake[J]. Disasters,2011,35(3):587-605.
- [6] Yang X,Xu W. Establishment of model and standard operation procedure for biotransformation of chemical con-

stituents of traditional Chinese medicine by human intestinal bacteria[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi,2011,36(1):19-26.

- [7] 黄红坤,郭伯安. GLP 实验室标准操作规程的管理和质量保证[J]. 中国实用医药,2009,4(24):257-258.
- [8] Barba D,Saris SC,Holder C,et al. Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas[J]. J Neurosurg,1989,70(2):175-182.
- [9] 郭小荣,董景文. 恶性肿瘤伴焦虑、抑郁患者的心理护理研究[J]. 护理研究,2011,25(1):54-55.
- [10] 张建群,倪嘉,陈显春,等. 对恶性肿瘤患者进行全程心理护理的效果分析[J]. 第三军医大学学报,2011,33(13):1424-1425.
- [11] 李梅,侯宜静,张雪枫,等. 恶性肿瘤化疗 73 例心理护理[J]. 齐鲁护理杂志,2011,7(10):112-113.
- [12] 程月芳. 心理护理对恶性肿瘤首次化疗患者的实施体会[J]. 中国实用医药,2011,6(20):190-191.

(收稿日期:2011-11-24 修回日期:2011-12-30)