DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.023
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
60 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)01-0060-03

慢性低水平铅暴露对发育期大鼠海马 NMDAR-1 mRNA 表达的影响

傅大干,李华强,史 源,蒋东波 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所儿科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨发育期低水平铅暴露对大鼠学习记忆影响的分子机制。方法 采用原位杂交技术,研究低水平铅暴露后发育期海马 NMDA 受体亚单位 1(NMDAR-1)mRNA 表达的变化。结果 铅暴露组大鼠海马区锥体细胞层 NMDAR-1 mRNA 与对照组相比在 16 d 时 CA1 区、CA3 区分别增加 18.75%和 13.2%($P<0.05$),而在齿状回颗粒细胞层表达却降低 14.29%($P<0.01$);在 32、64 d 除齿状回颗粒细胞层表达降低 9.67%、10.67%外($P<0.01$)外,其余各海马区未见有明显的光密度变化。结论 发育期铅暴露能导致 NMDAR-1 mRNA 表达的改变,进而影响 NMDAR-1 的表达,这可能是铅暴露影响学习记忆的分子机制之一。

关键词:铅暴露;海马;N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位 1 mRNA
中图法分类号:R135.11;R322.81;R392.2 文献标识码:A

Effects of chronic low lead exposure on NMDA receptor subunit 1 mRNA in hippocampus in rats at the developmental stage

FU Da-gan, LI Hua-qiang, SHI Yuan, JIANG Dong-bo (Department of Pediatrics, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effect of chronic low lead exposure on molecular pathological mechanisms of learning and memory of rats at the developmental stage. Methods The changes of N-methyl-D aspartate receptor 1 (NMDAR-1) mRNA expression in rat hippocampus were observed by using digoxigenin labled anti-sense oligonucleotide probes *in situ* hybridization technique. Results The changes in NMDAR-1 mRNA levels in Pb-exposed rat hippocampus were found to be dependent upon the developmental period of exposure and the region of the hippocampus analyzed. Hippocampal NMDAR-1 mRNA levels increased significantly in the CA1 (18.75%) and CA3 (13.2%) ($P<0.05$) pyramidal cells from 16-day-old Pb-exposed rats, but dentate gyrus NMDAR-1 mRNA decreased by 14.29% at the same same time ($P<0.01$). At 32nd day and 64th day, no changes were found except for a DG decrease of 9.67%, 10.67% ($P<0.01$). Conclusion NMDAR-1 mRNA expression in developing rats is altered by chronic low lead exposure, which might be a molecular mechanism for the persistent cognitive deficits that result from developmental exposure to Pb^{2+}.

Key words: lead; hippocampus; NMDAR-1 mRNA

N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)是兴奋性氨基酸受体的一种亚型,与脑发育及突触可塑性密切相关[1],是学习记忆细胞机制长时程增强(LTP)形成的关键因素[2]。而铅暴露时又导致 LTP 改变及认知功能缺陷[3]。NMDAR 亚单位 1(NMDAR-1)亚基在构成功能性 NMDAR 中起主要作用,是该受体的功能单位,为了进一步探讨铅暴露对学习记忆影响的分子机制,我们采用原位杂交的方法,研究发育期慢性低水平铅暴露后大鼠海马各区 NMDAR-1 mRNA 表达的变化。

作者简介:傅大干(1970-),男,湖北省松滋市人,博士研究生,主治医师,主要从事环境与儿童保健方面的研究,现在成都军区昆明总院儿科,昆明 650032。电话:(0871)4074627

收稿日期:2001-10-10;修回日期:2002-04-10

1 材料与方法

1.1 动物的分组及铅暴露

健康成年雌性 Wistar 大鼠随机分为两组并饲养于塑料笼具中,在食用相同合格饲料的条件下,于交配前 2 周开始分别饮用去离子水和 0.2%醋酸铅溶液,并且各自持续整个妊娠期和哺乳期。所产子代各 18 只用于实验,雌雄不拘且均于生后第 19 天时断乳,断乳后子代均饮用与其母相同的溶液。根据大鼠发育成熟的年龄段分别取子代出生后第 16、32、64 天作为本实验的 3 个时相点,每个时相点 6 只动物。

1.2 标本的制备

大鼠经乙醚吸入麻醉后仰卧固定,开胸暴露心脏,经右心耳取血约 2 ml 于抗凝管中置-20℃备用以测血铅,然后立即断头剥离大脑并沿正中线分为两个半球,在冰冷生理盐水中漂洗毕一侧半球用作测脑铅,另一侧半球置液氮中保存供原位杂交之

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用。在恒冷箱(－20℃)切片机上距 Lambda 点约 4 mm 左右做厚度为 15μm 连续额状切片, 将切片贴于 APES 包被的载玻片上晾干; 于含 0.1% DEPC 的 4% 多聚甲醛溶液中固定 10 min, 然后在 0.1% DEPC 水中漂洗、晾干; 置－70℃冰箱备原位杂交之用。

1.3　血铅、脑铅的测定

血铅测定: 取血 20μl 加入盛有 100μl 0.5% HNO_3 的管中, 再加 100μl H_2O_2 过夜, 用石墨炉原子吸收分光光度计测定。测定条件: 波长 283.3 nm, 狭缝 0.7 nm, 灯电流 7.0 mA。

脑铅测定: 称重, 按质量体积比为 1∶1.5 加入四甲基氢氧化铵, 振荡, 待组织完全溶解后, 用石墨炉原子吸收分光光度计测定(测定条件同血铅)。

质量控制: 样品采集、盛放处理过程中尽量避免外环境铅的污染; 以国家标准物质中心出品的标准物质作质量控制; 样品分析过程中间分插质量控制样品, 以保证分析结果的可信性。

1.4　NMDAR-1 原位杂交步骤

NMDAR-1 原位杂交试剂盒购自武汉 Boster 公司, 实验步骤按原位杂交试剂盒说明书进行, 并用 2μg/ml RNA 酶 A 预处理切片和用不含探针的预杂交液代替探针杂交作为对照试验。

1.5　图像分析及统计学处理

采用 MIG2 000 图文分析系统对切片进行图像分析, 所有鼠均在同一放大倍数(× 400)、同一光强度下分析, 每只鼠测 2 张切片, 每组共 12 张切片, 每张切片分别测海马 CA1、CA2、CA3 和齿状回(DG)。各测相同面积。分析指标: 平均吸光度(A)。

统计学处理: 采用社会科学统计程序包软件(SPSS8.0 for windows)进行独立样本 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　血铅及脑铅值

对照组各时相点的血铅值几乎均在 0.005μg/ml 以下, 而铅暴露组均在 0.1μg/ml 以上。同样脑铅值各对照组均在 0.1μg/g 以下, 说明模型制备是成功可靠的。本实验具体血铅及脑铅值见表 1。

表 1　对照组及铅暴露组大鼠在各时点血铅值与脑铅值比较(ρ_{Pb}/μg·ml^{-1}, ω_{Pb}/μg·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of blood lead and brain lead levels between control groups and lead exposure groups(ρ_{Pb}/μg·ml^{-1}, ω_{Pb}/μg·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	16 d		32 d		64 d	
	blood lead	brain lead	blood lead	brain lead	blood lead	brain lead
Control group	＜0.005	0.023±0.005	＜0.005	0.068±0.016	＜0.005	0.090±0.008
Lead group	0.141±0.045	0.190±0.048 *	0.261±0.069	0.755±0.065 *	0.221±0.026	0.493±0.057 *

*: P＜0.01 *vs* control group

2.2　NMDAR-1mRNA 在大鼠海马的分布及表达

光镜下观察, 对照组及铅暴露组 NMDAR-1mRNA 阳性细胞在海马区均主要分布于海马回锥体细胞层及齿状回颗粒细胞层, 阳性细胞表现为胞浆中出现棕黄色颗粒状物质。RNA 酶 A 预处理切片和无探针的预杂交液杂交切片未见任何特异性着色。

两组大鼠各时相点海马区 NMDAR-1 mRNA 的表达均以 CA3 区锥体细胞层所表达的平均光密度为最高, 以齿状回颗粒细胞层最低, 且发育期铅暴露对 NMDAR-1 mRNA 表达的影响具有明显的海马区域特异性及时间依赖性。即铅暴露组大鼠海马区锥体细胞层 NMDAR-1 mRNA 表达的平均光密度与对照组相比 16 d 时 CA1 区、CA3 区分别增加 18.75% 和 13.2%(P＜0.05), 而在齿状回颗粒细胞层表达却降低 14.29%(P＜0.01); 在出生第 32、64 天时与对照组相比除齿状回颗粒细胞层降低 9.67%、10.67%外(P＜0.01), 各海马区未见有明显光密度变化, 见表 2 及图 1、2。

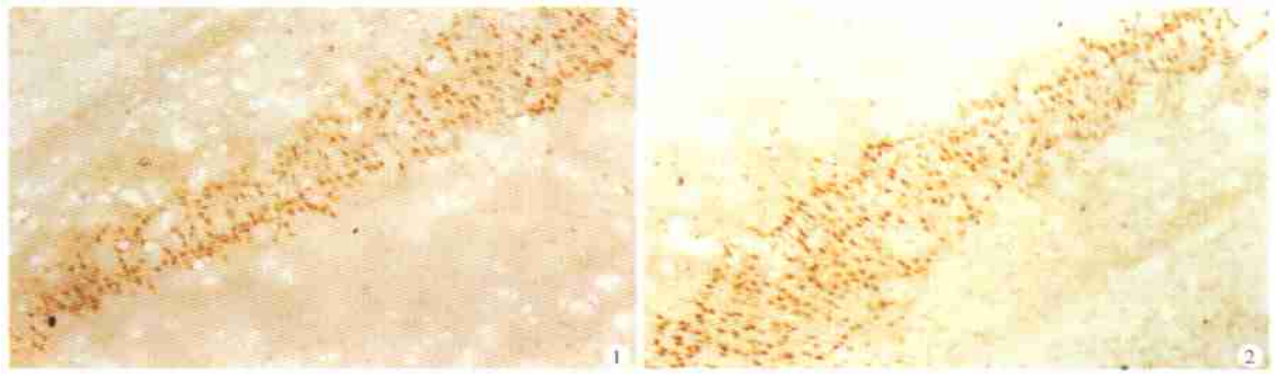


图 1　对照组第 16 天海马 CA1 区锥体细胞层 NR1mRNA 的表达　(DAB× 100)

Fig 1　Expression of NR1mRNA in pyramidal cell layer of CA1 in control group at 16th day　(DAB× 100)

图 2　铅暴露组第 16 天海马 CA1 区锥体细胞层 NR1mRNA 的表达　(DAB× 100)

Fig 2　Expression of NR1mRNA in pyramidal cell layer of CA1 in Lead exposure group at 16th day　(DAB× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 对照组与铅暴露组海马区NMDAR-1 mRNA表达的比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Expression of NMDAR-1 mRNA between control groups and lead exposure groups($\bar{x}\pm s$)

(d)	CA1		CA2		CA3		DG	
	Control	Lead	Control	Lead	Control	Lead	Control	Lead
16	0.32±0.01	0.38±0.05 *	0.33±0.04	0.34±0.03	0.38±0.02	0.44±0.03 **	0.34±0.01	0.29±0.01 **
32	0.33±0.01	0.34±0.01	0.33±0.02	0.35±0.01	0.40±0.01	0.41±0.01	0.29±0.03	0.26±0.05 **
64	0.33±0.02	0.32±0.01 *	0.32±0.01	0.31±0.01	0.34±0.02	0.32±0.01	0.30±0.01	0.26±0.01 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* Control group

3 讨论

兴奋性氨基酸受体中最为引人注目的是N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)，NMDAR蛋白之cDNA表达两个亚单位，即NMDAR-1和NMDAR-2，其中NMDAR-1具有NMDAR受体的一切药理学和电生理学特性，且有报道NMDAR-1基因紊乱将使NMDA反应消失[4]。因此，NMDAR-1亚基是NMDAR的功能亚单位，另外，Kew等[5]采用定点突变和同源重组的方法又进一步证实了NMDAR与LTB及空间学习记忆能的密切关系。而我们的水迷宫实验证实了发育早期铅暴露即影响大鼠空间学习记忆能力[6]。又因为海马是目前公认的与学习记忆有关的关键部位，故而本实验试图从基因水平来研究铅暴露对海马区NMDAR-1 mRNA表达的影响。

实验显示对照组海马各区NMDAR-1 mRNA的表达随年龄变化的趋势与Monyer等[7]报道的正常发育期大鼠海马NMDAR-1 mRNA的表达变化过程相一致。铅暴露组大鼠的血铅、脑铅值在出生后第16天时较第32天、第64天时均低，这可能与后者断乳后已经直接铅暴露有关。铅暴露组大鼠出生后第16天CA1区及CA3区NMDAR-1 mRNA的表达均较对照组增高(分别为18.75%，13.2%)，但发现齿状回颗粒细胞层NMDAR-1 mRNA的表达却有减低(14.29%)。另外，在第32天除齿状回颗粒细胞层表达降低外(9.67%)，其余各区未见有明显变化。而在几近成年阶段的第64天则发现海马各区NMDAR-1 mRNA的表达较对照组都有不同程度的减低，又尤以齿状回部位减低最为明显(10.67%)，这与Nihei等[8]的研究结果相一致。由上可见铅暴露对NMDAR-1 mRNA表达的影响以出生后海马仍处于发育期的第16天最为明显，这可能与未成熟海马对铅的敏感性较高有关，同时也提示铅暴露在发育早期即断乳前就可导致NMDAR-1 mRNA的改变。而NMDAR又是学习记忆密切相关的LTP形成的关键因素[2]，我们推测铅暴露在发育早期导致NMDAR-1mRNA水平的改变可能影响NMDAR-1蛋白的表达，进而影响海马的电生理特性和LTP的形成即突触重建，使得以后在脑逐步成熟过程中铅暴露对NMDAR-1 mRNA表达的影响虽然有所减轻，成年时却仍伴有学习记忆功能的损伤。

综上所述，发育期持续铅暴露能使海马区NMDAR-1 mRNA表达发生改变，而这种改变可能是铅暴露时导致大鼠学习记忆和LTP损害的分子机制之一。

（致谢：感谢重庆市疾病控制中心王虹主任协助测定血铅和脑铅！）

参考文献：

[1] Scheetz AJ, Constantine-Paton M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development[J]. FASEB J, 1994, 8(10): 745—752.

[2] Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, *et al*. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor[J]. Nature, 1991, 354(6348): 31—37.

[3] Nihei M K, Guilarte T R. Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb^{2+}: association with deficits of LTP and spatial learning[J]. Neurotoxicology, 2001, 22(5): 635—543.

[4] Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, *et al*. Targeted disruption of NMDA receptor gene abolishes NMDA response and results in neonatal death[J]. Neuron, 1994, 13(2): 325—329.

[5] Kew J N, Koester A, Moreau J L, *et al*. Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site[J]. J Neurosci, 2000, 20(11): 4037—4049

[6] 傅大干，李华强，史 源，等. 脑发育不同阶段铅暴露对大鼠学习记忆能力及海马CA1区长时程增强的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2001，19(6)：464—465.

[7] Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, *et al*. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors [J]. Neuron, 1994, 12(3): 529—540

[8] Nihei M K, Desmond N L, Mcglothan J L, *et al*. N-methyl-d-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning[J]. Neurosci, 2000, 99(2): 233—242

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net