

三氧化二砷对小鼠大脑组织神经递质代谢酶基因及其受体基因表达谱的影响

王艳艳¹, 姜红梅¹, 安玉¹, 邵小翠¹, 朴丰源²

摘要: [目的] 研究亚慢性砷暴露对小鼠大脑组织神经递质代谢酶基因及其受体基因表达谱的影响。[方法] 小鼠按体重随机分为 3 组, 每组 2 只: 4 mg/L 三氧化二砷 (As_2O_3) 染毒组、1 mg/L As_2O_3 染毒组和生理盐水对照组。染毒组小鼠饮用含 As_2O_3 自来水, 对照组饮用 0.9% 生理盐水, 各组小鼠每天消耗水量约 20 mL, 均连续饮用 60 d, 之后对其大脑组织进行基因芯片研究。[结果] 与对照组比较, 染砷组小鼠大脑组织的基因 *Th*、*Dbh*、*Tph1*、*Drd3*、*Drd4*、*Adra1a*、*Adra2a*、*Adra2b* 和 *Adrb3* 表达下调, 而基因 *Htr1f*、*Htr4*、*Htr7* 表达上调。[结论] As_2O_3 可能导致小鼠大脑组织部分神经递质合成和分解代谢酶基因表达下调, 且干扰其部分受体基因的表达。

关键词: 三氧化二砷; 大脑组织; 神经递质; 代谢酶基因; 受体基因; 差异表达; 小鼠

Influence of Arsenic Trioxide on Gene Expression Profiles of Metabolic Enzymes and Receptors for Neurotransmitters in Cerebrum of Mice WANG Yan-yan¹, JIANG Hong-mei¹, AN Yu¹, SHAO Xiao-cui¹, PIAO Feng-yuan² (1.Dalian Municipal Center for Disease Control and Prevention, Dalian, Liaoning, 116021, China; 2.Department of Occupational and Environmental Hygiene, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China). Address correspondence to PIAO Feng-yuan, E-mail: piaofy_dy@yahoo.com.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the effect on gene expression profiles of metabolic enzymes and receptors for neurotransmitters in cerebrum of mice by chronic exposure. [Methods] The rats were randomly divided into three groups: 4 mg/L arsenic trioxide (As_2O_3), 1 mg/L As_2O_3 , and the control groups. After 60 days of exposure to As_2O_3 through drinking water, expressions of target genes in cerebrum of mice were studied by genechip. [Results] Compared to the control group, the expressions of gene *Th*, *Dbh*, *Tph1*, *Drd3*, *Drd4*, *Adra1a*, *Adra2a*, *Adra2b*, and *Adrb3* of mouse cerebrum in two treated groups were statistically down-regulated, while the expressions of gene *Htr1f*, *Htr4*, and *Htr7* were up-regulated. [Conclusion] As_2O_3 may down-regulate the gene expressions of neurotransmitter synthesis and catabolism enzymes and interfere with the gene expressions of partial neurotransmitter receptors in mouse cerebrum.

Key Words: arsenic trioxide; cerebrum; neurotransmitters; metabolic enzyme gene; receptor gene; differential expression; mice

砷化合物用途广泛, 人类接触机会也多。主要职业接触有: 砷矿开采和冶炼; 含砷农药的制造、使用和贮存; 含砷元素及化合物[例如三氧化二砷 (As_2O_3)]的生产, 如玻璃、油漆、颜料、陶瓷等的制造; 纺织印染、鞣革和皮毛硝蚀杀虫防腐; 半导体化学物的生产等。流行病学调查发现, 长期砷暴露可影响中枢神经系统正常功能, 导致学习记忆能力下降^[1]。乙酰胆碱^[2], 单胺类神经递质-去甲肾上腺素^[3]、多巴胺^[3]、5-羟色胺^[3], 氨基酸类神经递质-谷氨酸^[4-5]、 γ -氨基丁酸^[6]等是脑内重要的神经递质, 在大脑学习和记忆过程中发挥重要作用。近几年, 许多研究人员开始关注一些神经毒物对中枢神经系统

递质合成和分解代谢途径的影响^[1,7]。其中, KANNAN 等^[8]发现, 砷可以影响大鼠脑中单胺氧化酶、多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺等多种神经递质稳定性及其在脑中的浓度, 从而扰乱学习、记忆等功能活动。神经递质需要通过分泌、储存、运输、受体结合及分解等一系列过程, 方可产生效应。本课题组前期研究结果也显示, 慢性砷暴露可影响小鼠脑组织中 *Slc6a2* 等神经递质传递相关基因的表达, 从而干扰神经递质在突触前膜的正常分泌及其与特异性受体结合^[9]。本研究拟利用基因芯片结果, 进一步分析 As_2O_3 对小鼠大脑组织的乙酰胆碱、单胺类神经递质和氨基酸类神经递质合成和分解代谢酶基因及各神经递质受体基因表达谱的影响, 为研究砷导致小鼠学习记忆能力下降的毒性作用机制提供相关基因表达信息。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 30571584, 30600488); 辽宁省教育厅项目(编号: 05L113)

[作者简介] 王艳艳(1981—), 女, 硕士, 医师; 研究方向: 公共卫生与预防医学; E-mail: yanyanwang_473@yahoo.com.cn

[通信作者] 朴丰源教授, E-mail: piaofy_dy@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116021; 2. 大连医科大学劳动卫生与环境卫生学教研室, 辽宁 大连 110644

1 材料与方法

1.1 实验动物及染毒

成熟健康昆明种小鼠 6 只, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 由大连医科大学实验动物中心提供。按体重随机分为 3 组, 每组

2 只: 4 mg/L、1 mg/L As₂O₃ 染毒组和生理盐水对照组。染毒组小鼠通过自然饮用含 As₂O₃ 自来水方式进行神暴露, 对照组饮用 0.9% 生理盐水, 每只小鼠每天消耗水量约为 20 mL, 连续染毒 60 d, 各组小鼠累计染毒量分别为 1.2、4.8 和 0 mg。染毒结束后, 将小鼠断头处死并立即取大脑储存于 RNA 组织样品保护液中, 备用。

1.2 主要试剂和设备

TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); RNeasy Mini Kit(美国 OIAGEN 公司); DEPC-Water(美国 Ambion 公司); Herring Sperm DNA(美国 Promega 公司); BSA(美国 Invitrogen 公司); MOPS(上海 Sagon 公司); β-Mercaptoethanol(上海 Sagon 公司); Normal Goat IgG(美国 Sigma 公司); GeneArray™ 扫描仪 3000(美国 Affymetrix 公司)、全自动芯片洗涤工作站 450(美国 Affymetrix 公司)、基因芯片杂交箱 640(美国 Affymetrix 公司)、Microarray Suite Version 5.0 分析软件(美国 Affymetrix 公司)等。

1.3 总 RNA 的提取和基因芯片杂交

分别将各实验组(1 mg/L 和 4 mg/L)和对照组小鼠大脑在液氮中进行研磨, 依 TRIzol 试剂盒操作说明从大脑组织中抽提总 RNA, 用 RNeasy Mini Kit 进行纯化。提取的 RNA 在紫外分光光度仪下测定 RNA 的浓度和纯度, 同时运用变性胶电泳检测 RNA 有无降解; 然后反转录成 cDNA, 用 RNA 转录标记试剂盒进行体外转录合成 cRNA 探针, 合成的同时进行生物素标记;

生物素标记的 cRNA 探针经片段化处理后与 Mouse Genome 430 2.0 Array 基因芯片在杂交箱 640 中 45℃ 杂交 16 h, 然后于全自动芯片洗涤工作站 450 中洗脱、染色; 最后用 GeneArray™ 扫描仪 3000 扫描杂交信号。

1.4 芯片数据处理和生物学信息分析

杂交结果用美国 Affymetrix 公司的 Microarray Suite Version 5.0 软件进行分析。在对单个样本表达分析的前提下, 根据 $P < 0.04$ 为表达, 0.04~0.06 为临界, $P > 0.06$ 为不表达, 分别建立 4 mg/L、1 mg/L As₂O₃ 染毒组和生理盐水对照组大脑组织的基因表达谱; 然后将二者的基因表达谱进行比较, 根据实验样品与对照样品的基因转录产物表达比值(signal log ratio, SLR)判断。SLR > 1 为表达上调, SLR < -1 为表达下调, 建立各组差异表达的数据库。

2 结果

2.1 神经递质合成和分解代谢酶基因

与对照组比较, 基因 *Th*、*Dbh*、*Sdha*、*Aldh7a1* 和 *Tph1* 在 2 个染毒组小鼠大脑组织的表达均下调, 但在 1 mg/L As₂O₃ 染毒组与 4 mg/L 染毒组小鼠大脑组织的表达差异无统计学意义。与对照组比较, 基因 *Pck1*、*Chat* 在 2 个染毒组小鼠大脑组织的表达均下调, 且在 1 mg/L As₂O₃ 染毒组高于 4 mg/L 染毒组(表 1)。

表 1 小鼠大脑组织神经递质代谢酶相关基因差异表达信息谱

Table 1 Gene expression profile of neurotransmitter-related metabolic enzymes for neurotransmitters in cerebrum of mice

神经递质类别 Neurotransmitter category	神经递质 Neurotransmitters	基因符号 Gene symbol	探针号 Probe set	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 1 mg/L As ₂ O ₃ vs control	4 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 4 mg/L As ₂ O ₃ vs control	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃ 1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃
乙酰胆碱类 (Acetylcholine)	乙酰胆碱 Acetylcholine	<i>Chat</i>	1440070_at	-6.50	-13.00	2.46
	去甲肾上腺素 Norepinephrine	<i>Th</i>	1420546_at	-2.46	-2.46	1.15
		<i>Dbh</i>	1450670_at	-2.46	-3.03	-1.07
		<i>Aldh7a1</i>	1415902_at	-5.66	-4.92	1.07
		<i>Tph1</i>	1419524_at	-3.03	-4.59	1.00
单胺类 (Monoamines)	5-羟色胺 5-Hydroxy-tryptophan					
氨基酸类 (Amino acids)	γ-氨基酸 GABA	<i>Sdha</i>	1445317_at	-2.83	-3.03	1.00
		<i>Pck1</i>	1423439_at	-12.13	-10.56	2.46

2.2 神经递质受体基因

与对照组比较, 基因 *Grin2d*、*Gria2*、*Drd3*、*Drd4*、*Htr1d*、*Htr5b* 和 *Adra1a* 在 2 个染毒组表达均下调, 但在 4 mg/L As₂O₃ 染毒组和 1 mg/L As₂O₃ 染毒组间差异无统计学意义。与对照组比较, 基因 *Adra2a*、*Adra2b* 和 *Adrb3* 在 4 mg/L As₂O₃ 染毒组和

1 mg/L 染毒组表达均下调, 且在 1 mg/L As₂O₃ 染毒组低于 4 mg/L 染毒组。与对照组比较, 基因 *Drd1a*、*Htr1f*、*Htr4*、*Htr7*、*Chrm1* 和 *Grin3b* 在 2 个染毒组表达均上调, 但其表达在 4 mg/L As₂O₃ 染毒组和 1 mg/L As₂O₃ 染毒组间差异无统计学意义(表 2)。

表 2 小鼠大脑组织神经递质受体相关基因差异表达信息谱

Table 2 Gene expression profile of neurotransmitter-related receptors in cerebrum of mice

神经递质类别 Neurotransmitter category	神经递质 Neurotransmitters	基因符号 Gene symbol	探针号 Probe set	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 1 mg/L As ₂ O ₃ vs control	4 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 4 mg/L As ₂ O ₃ vs control	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃ 1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃
乙酰胆碱类 (Acetylcholine)	乙酰胆碱 Acetylcholine	<i>Chrm1</i>	1450833_at	4.59	3.48	-1.62
		<i>Drd3</i>	1422278_at	-4.00	-3.25	1.15
		<i>Drd4</i>	1422830_s_at	-4.29	-4.59	-1.07
单胺类 (Monoamines)	多巴胺 Dopamine	<i>Drd1a</i>	1456051_at	2.00	2.46	1.23

续表 2

神经递质类别 Neurotransmitter category	神经递质 Neurotransmitters	基因符号 Gene symbol	探针号 Probe set	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 1 mg/L As ₂ O ₃ vs control	4 mg/L As ₂ O ₃ vs 对照组 4 mg/L As ₂ O ₃ vs control	1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃ 1 mg/L As ₂ O ₃ vs 4 mg/L As ₂ O ₃
单胺类 (Monoamines)	5-羟色胺 5-Hydroxy-tryptophan	<i>Htr1d</i>	1422290_at	-3.73	-4.00	-1.15
		<i>Htr5b</i>	1422196_at	-4.00	-4.59	-1.41
		<i>Htr1f</i>	1440422_at	4.00	3.25	-1.32
		<i>Htr4</i>	1427654_a_at	2.83	3.03	1.15
		<i>Htr7</i>	1422235_at	3.48	2.46	1.52
	去甲肾上腺素 Norepinephrine	<i>Adra1a</i>	1421659_at	-3.73	-3.03	1.52
		<i>Adra2a</i>	1433601_at	-59.71	-9.85	3.48
		<i>Adra2b</i>	1439645_at	-27.86	-5.28	3.03
		<i>Adrb3</i>	1421555_at	-34.30	-4.59	6.96
		<i>Grin2d</i>	1421393_at	-2.83	-3.48	-1.23
氨基酸类 (Amino acids)	谷氨酸 Glutamic acid	<i>Gria2</i>	1445962_at	-4.29	-3.73	1.23
		<i>Grin3b</i>	1449899_at	7.46	6.96	-1.15

3 讨论

流行病学调查显示, 砷中毒对青少年中枢神经递质损害主要表现为对学习记忆能力的损害。动物实验结果与流行病学调查一致。目前, 砷致学习记忆能力损害的分子机制尚不十分清楚。神经科学研究证明, 脑中各种神经递质的稳定性直接影响学习与记忆功能。KANNAN 等^[8]发现, 砷可以影响大鼠脑中单胺氧化酶、乙酰胆碱、多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺等多种神经递质的稳定性及其在脑中的浓度。为了进一步从分子水平研究砷对中枢神经系统学习记忆能力损伤的毒性作用机制, 本课题组利用基因芯片技术分析了亚慢性砷暴露对小鼠大脑组织神经递质合成和分解代谢酶及其受体基因表达的影响。

本课题组之前的研究结果显示, 染砷组小鼠脑中 5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素 3 种单胺类神经递质浓度均明显低于对照组^[10], 这与 TRIPATHI 等^[11]的研究结果一致。本次基因芯片分析结果显示, 单胺类神经递质合成酶基因 *Th*、*Dbh* 和 *Tph1* 在 2 个剂量砷暴露组小鼠大脑组织中的表达均低于对照组。这些结果提示, 亚慢性砷暴露可能通过降低单胺类神经递质合成酶基因 *Th*、*Dbh* 和 *Tph1* 的表达而导致其浓度降低。

另外, 2 个砷暴露组小鼠与对照组比较, 大脑组织内 5-羟色胺受体基因 (*Htr1f*、*Htr4*、*Htr7*) 表达上调, 多巴胺受体基因 (*Drd3*、*Drd4*) 表达下调, D4 受体存在于大脑皮层和海马, 调控 γ-氨基丁酸的传递, 砷导致 *Drd4* 基因表达下调, 也可能将会影响 γ-氨基丁酸的传递。肾上腺素受体基因 (*Adra1a*、*Adra2a*、*Adra2b*、*Adrb3*) 表达下调, 其中, *Adra2a*、*Adra2b*、*Adrb3* 在 1 mg/L As₂O₃ 染毒组小鼠大脑组织的表达分别比对照组低 59.71、27.86、34.30 倍, 差异表达明显。

As₂O₃ 可能导致小鼠大脑组织部分乙酰胆碱、单胺类神经递质和氨基酸类神经递质合成和分解代谢酶基因表达下调, 且干扰其部分受体基因表达水平, 这可能是其导致小鼠学习记忆能力下降的分子毒性机制之一。今后需进一步验证这些异常表达基因在蛋白水平的表达, 以及深入探讨大脑组织神经递质代谢酶及其受体相关基因异常表达与砷暴露人群神经行为异常之间的关系。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] 毕伟东, 王成艳, 靳立巾, 等. 砷中毒大鼠大脑皮层乙酰胆碱酯

酶活性及其行为学变化[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(1): 29-30.

[2] WINKLER J, SUHR ST, GAGE FH, et al. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory[J]. Nature, 1995, 375(6531): 484-487.

[3] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, et al. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments[J]. Brain Res Bull, 2003, 60(3): 283-296.

[4] COLLINGRIDGE GL, SINGER W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity[J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(7): 290-296.

[5] SALINSKA E, STAFIEJ A. Metabotropic glutamate receptors(mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release[J]. Neurochem Int, 2003, 43(4/5): 469-474.

[6] FARR SA, UEZU K, CREONTE TA, et al. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 65(3): 363-368.

[7] 曲春清, 牛玉红, 钟媛, 等. 亚慢性砷暴露对小鼠脑谷氨酸-谷氨酰胺循环通路的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(10): 751-754.

[8] KANNAN G M, TRIPATHI N, DUBE S N, et al. Toxic effects of arsenic(Ⅲ) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2001, 39(7): 675-682.

[9] 刘鹏, 朴丰源, 王艳艳, 等. 砷对小鼠小脑神经递质传递相关基因表达影响的基因芯片研究[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(5): 401-404.

[10] 张璇, 朴丰源, 刘鹏. 砷对小鼠脑单胺类神经递质浓度影响及牛磺酸、维生素 C 的保护作用[J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(2): 102-106.

[11] TRIPATHI N, KANNAN G M, PANT B P, et al. Arsenic-induced change in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain[J]. Toxicol Lett, 1997, 92(3): 201-208.

(收稿日期: 2011-11-20)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 徐新春; 校对: 王晓宇)