

亚慢性铝染毒对大鼠海马 CPEB3 及突触可塑性的影响

纪晶晶¹, 王艳妮², 王国美¹, 夏轶¹, 徐义荣¹, 吴惠文¹

1. 山西医科大学汾阳学院, 山西 汾阳 032200

2. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 铝的神经毒性表现为学习记忆能力受损, 突触可塑性下降是铝致学习记忆受损的主要机制, 但其分子机制并不清楚。

[目的] 探讨亚慢性染铝对大鼠海马多聚腺苷酸化元件结合蛋白 3 (CPEB3) 以及突触可塑性的影响。

[方法] 取 40 只 2 月龄健康雄性 SD 大鼠, 随机分为 4 组, 分别为对照组、低剂量组 ($10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中剂量组 ($20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和高剂量组 ($40\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的麦芽酚铝染毒组, 每组 10 只。腹腔注射染铝, 每 100 g 体重染毒剂量为 0.1 mL, 对照组大鼠给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 隔天染铝, 持续 3 个月。采用 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力, Western blotting 法检测 CPEB3、突触后致密蛋白 95 (PSD95)、离子型谷氨酸受体 1 (GluR1)、离子型谷氨酸受体 2 (GluR2)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 蛋白的表达水平, RT-PCR 检测 *PSD95*、*GluR1*、*GluR2*、*CREB* 和 *BDNF* mRNA 的表达水平, 免疫组化检测 CPEB3 蛋白的表达。

[结果] Morris 水迷宫结果显示: 中高剂量染铝组大鼠的学习记忆能力明显受损。中、高剂量染铝组大鼠第 3、4、5 天的逃避潜伏期均高于同时间点对照组大鼠 (分别延长了 4.88、7.24、3.92 s 和 6.41、9.27、6.08 s, $P < 0.05$), 第 6 天目标象限停留时间和穿越平台次数均低于对照组 (分别减少了 13.21、16.46 s 和 0.9、1.6 次, $P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 中、高剂量染铝组大鼠海马组织中 CPEB3 (0.50 ± 0.06 、 0.33 ± 0.07)、PSD95 (0.45 ± 0.08 、 0.28 ± 0.06)、GluR1 (0.38 ± 0.07 、 0.31 ± 0.06)、GluR2 (0.45 ± 0.08 、 0.33 ± 0.09)、CREB (0.58 ± 0.11 、 0.41 ± 0.07) 和 BDNF (0.49 ± 0.03 、 0.33 ± 0.05) 蛋白表达水平均低于对照组 (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示, 中、高剂量染铝组大鼠海马中 *PSD95*、*GluR1*、*GluR2*、*CREB*、*BDNF* 的 mRNA 表达水平均低于对照组, $P < 0.05$ 。免疫组化结果显示, CPEB3 蛋白主要表达于大鼠的海马组织的神经元胞质中, 且随着染铝浓度的增加而降低。

[结论] 亚慢性染铝可以导致大鼠学习记忆能力受损以及突触可塑性蛋白下调, 其可能通过影响 CPEB3 的表达从而抑制突触可塑性相关蛋白的合成, 引起学习记忆能力受损。

关键词: 多聚腺苷酸化元件结合蛋白 3; 铝; 突触可塑性; 学习记忆能力

Effects of subchronic aluminum exposure on hippocampal CPEB3 and synaptic plasticity in rats
JI Jingjing¹, WANG Yanni², WANG Guomei¹, XIA Yi¹, XU Yirong¹, WU Huiwen¹ (1. Shanxi Medical University Fenyang College, Fenyang, Shanxi 032200, China; 2. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] The neurotoxicity of aluminum is characterized by impaired learning and memory, and decreased synaptic plasticity is the main mechanism of the impairment, but associated molecular mechanism is not clear.

[Objective] This experiment is designed to investigate the effects of subchronic aluminum exposure on the expression of cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3 (CPEB3) and synaptic plasticity in rat hippocampus.

[Methods] Forty two-month-old healthy male SD rats were randomly divided into four groups: control group, low-dose aluminum group ($10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle-dose aluminum group ($20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose aluminum group ($40\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. The rats of the aluminum-

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21043

基金项目

国家自然科学基金青年基金项目 (81803208); 山西省教育厅高等学校科技创新项目 (2019L0997)

作者简介

纪晶晶 (1992—), 女, 硕士生;
E-mail: 739498358@qq.com

通信作者

徐义荣, E-mail: yirongxu@163.com
吴惠文, E-mail: wuhuiwen@yeah.net

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-01-24

录用日期

2021-05-21

文章编号

2095-9982(2021)07-0717-08

中图分类号

R135

文献标志码

A

► 引用

纪晶晶, 王艳妮, 王国美, 等. 亚慢性铝染毒对大鼠海马 CPEB3 及突触可塑性的影响 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (7): 717-724.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21043

Funding

This study was funded.

Correspondence to

XU Yirong, E-mail: yirongxu@163.com
WU Huiwen, E-mail: wuhuiwen@yeah.net

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-01-24

Accepted

2021-05-21

► To cite

JI Jingjing, WANG Yanni, WANG Guomei, et al. Effects of subchronic aluminum exposure on hippocampal CPEB3 and synaptic plasticity in rats [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 717-724.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21043

exposed groups were intraperitoneally injected of 0.1 mL per 100 g body weight maltol aluminum every other day for three months. The rats of the control group were given 0.9% sodium chloride solution. Morris water maze was used to test the learning and memory ability of the rats. The protein expressions of CPEB3, postsynaptic dense protein 95 (PSD95), ionic glutamate receptor 1 (GluR1), ionic glutamate receptor 2 (GluR2), cAMP-response element binding protein (CREB), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected by Western blotting. The mRNA expressions of *PSD95*, *GluR1*, *GluR2*, *CREB*, and *BDNF* were tested by RT-PCR. The expression of CPEB3 was also determined by immunohistochemistry.

[Results] The results of Morris water maze showed that the learning and memory ability of the rats exposed to medium and high doses of aluminum were significantly impaired. The escape latencies on the 3rd, 4th, and 5th days in the middle- and high-dose aluminum groups were longer than those in the control group at the same time point (increased by 4.88, 7.24, and 3.92 s for the middle-dose group, and 6.41, 9.27, and 6.08 s for the high-dose group, respectively, $P < 0.05$), the time of staying in target quadrant was shorter (shortened by 13.21 and 16.46 s respectively, $P < 0.05$), and the times of crossing platform were decreased (reduced by 0.9 and 1.6 times respectively, $P < 0.05$) on the 6th day. The results of Western blotting showed that the protein expression levels of CPEB3 (0.50 ± 0.06 , 0.33 ± 0.07), PSD95 (0.45 ± 0.08 , 0.28 ± 0.06), GluR1 (0.38 ± 0.07 , 0.31 ± 0.06), GluR2 (0.45 ± 0.08 , 0.33 ± 0.09), CREB (0.58 ± 0.11 , 0.41 ± 0.07), and BDNF (0.49 ± 0.03 , 0.33 ± 0.05) in the hippocampus of the middle- and high-dose groups were lower than those of the control group (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$). The results of RT-PCR showed that the mRNA expression levels of *PSD95*, *GluR1*, *GluR2*, *CREB*, and *BDNF* in the hippocampus of rats exposed to middle and high doses of aluminum were lower than those of the control group ($P < 0.05$). The immunohistochemical results showed that CPEB3 was mainly expressed in the neuronal cytoplasm of rat hippocampus and decreased with the increase of aluminum concentration.

[Conclusion] Subchronic aluminum exposure can lead to learning and memory impairment and down-regulation of synaptic plasticity protein in rats, possibly by inhibiting synaptic plasticity-related protein via affecting the expression of CPEB3.

Keywords: cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3; aluminum; synaptic plasticity; learning and memory ability

铝在地壳元素中含量位居第三, 广泛应用于人类的生产生活中, 而且铝与阿尔茨海默病等神经退行性疾病有关^[1]。铝可以穿透血脑屏障^[2-3], 是一种明确的神经毒物, 易蓄积在海马组织, 导致认知功能损害。目前人们认为铝主要引起学习记忆能力下降, 而突触可塑性下降是铝致学习记忆受损的主要机制, 神经元的突触可塑性包括结构可塑性和功能可塑性, 无论是结构还是功能可塑性都需要大量突触可塑性相关蛋白质 (synaptic plasticity related proteins, PRPs) 的合成。研究发现, 铝暴露可以不同程度抑制突触膜上受体蛋白如 AMPA 型谷氨酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR) 的表达, 降低突触传递效能; 而且铝可以使突触可塑性相关的下游蛋白分子如环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 等活性下降、表达减少, 从而引起突触可塑性下降^[4-5]。

多聚腺苷酸化元件结合蛋白 3 (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3, CPEB3) 是一种高度保守、序列特异的 mRNA 结合蛋白。通过与靶 mRNA 的多聚腺苷酸序列结合, 参与 mRNA 的多聚腺苷酸化, 来控制靶 mRNA 的翻译^[6]。研究发现 CPEB3 是一种新的参与突触可塑性和学习记忆的重要调节因子, 通过调控突触局部 mRNAs 的翻译来控制多种突触可塑相关蛋白 (synaptic plasticity-related protein,

PRPs) 的合成, 从而参与长时程突触可塑性的维持^[7-9], 在长时程记忆中发挥着分子开关的作用。研究发现, CPEB3 可以与离子型谷氨酸受体 1 (ionic glutamate receptor 1, GluR1) mRNA 结合通过促进 mRNA 多聚腺苷酸化水平, 调节 GluR1 蛋白的合成^[7, 10]。CPEB3 还可以通过同样机制在转录后水平影响离子型谷氨酸受体 2 (ionic glutamate receptor 2, GluR2) 和突触后致密蛋白 95 (postsynaptic dense protein 95, PSD95) 的表达, 影响突触可塑性^[11]。

那么铝是否可以影响 CPEB3 进而影响突触可塑性蛋白的表达, 参与铝致学习记忆损害的分子过程呢? 本研究通过建立亚慢性染铝动物模型, 探讨 CPEB3 作为铝的神经毒性潜在治疗靶点可能性, 为亚慢性铝暴露患者的治疗提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康 2 月龄雄性 SD 大鼠 40 只, 购自中国食品药品检定研究院, 许可证号 SCXK (京) 2017-0005, 体重 180~200 g。饲养于 12 h 光暗循环的洁净动物房, 温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 自由饮水饮食。本研究经山西医科大学汾阳学院动物伦理委员会审查批准 (编号: 201801)。

1.1.2 实验试剂和仪器 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和麦芽酚 (美国 Sigma 公司), GAPDH 抗体 (中国北京康为公司),

CPEB3、PSD95、GluR1、GluR2、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (英国 Abcam 公司), CREB 抗体 (美国 Gene Tex 公司), RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂和 SYBR Premix Ex Taq II (日本 TaKaRa 公司)。RT-qPCR 仪 (美国赛默飞公司), Morris 水迷宫及视频轨迹跟踪分析系统 (中国深圳瑞沃德公司), 电泳仪 (中国北京六一), Bio-Rad 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及铝暴露 随机数字法将大鼠分为 4 组, 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量麦芽酚铝组, 每组 10 只。麦芽酚铝 $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 溶液的配制方法参照 Li 等^[12] 制备方法, 根据世界卫生组织推荐的人体每周允许铝最低暴露量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[13], 换算为大鼠的低染毒剂量, 并按照 2 倍梯度递增, 得到中、高染毒剂量组。对照组大鼠给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 实验组分别为低剂量组 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和高剂量组 ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 染毒组。腹腔注射染铝, 每 100 g 体重染毒量为 0.1 mL, 隔天染铝, 持续 3 个月。实验期间, 每日观察各组大鼠饮水与饲料消耗情况、精神状况及整体状况等。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 实验装置为一个高 45 cm、直径 100 cm 的圆形水池, 平台位于其中一个固定象限水面下 1~2 cm。前 5 d 进行定位航行实验, 每天将大鼠随机从 4 个象限面向池壁放入水中, 记录其找到水面下平台时间, 训练时长为 120 s, 若 120 s 未找到平台者, 引导大鼠找到平台停留 10 s。第 6 天为空间探索实验, 移除平台, 随机选一个象限入水, 记录大鼠在 120 s 内目标象限停留时间和穿越平台的次数。

1.2.3 Western blotting 检测 PRPs 和 CPEB3 的表达水平 麻醉大鼠, 断头处死, 冰上分离海马。称量海马, 提取总蛋白。BCA 法将各组蛋白定至同一浓度, 加入 5× 上样缓冲液, 100℃ 煮沸变性 5 min 后, 保存在 -80℃。8% SDS-PAGE 分离胶和 3.9% SDS-PAGE 积层胶, 上样量均为 60 μg, 电泳 60 V 120 min, 转膜 400 mA 湿转 70 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 一抗 CPEB3、PSD95、GluR1、GluR2、CREB、BDNF 和 GAPDH (稀释比为 1:500、1:1000、1:2000、1:2000、1:500、1:500 和 1:3000), 4℃ 孵育过夜, 次日以 TBST 洗 10 min, 3 次; 37℃ 孵育二抗 2 h, TBST 洗 10 min, 3 次。ECL 试剂显影, 凝胶成像仪检测。

1.2.4 免疫组化检测 CPEB3 蛋白的表达量 将石蜡切

片置于二甲苯中脱蜡, 梯度酒精脱水; 3% H_2O_2 室温孵育 30 min; 枸橼酸抗原修复液热修复 2 min; BSA 封闭液 37℃ 孵育 30 min; 一抗 (1:200) 4℃ 孵育过夜; 二抗 37℃ 孵育 30 min; 链霉素生物素复合物 37℃ 孵育 30 min; DAB 显色, 苏木素浸染 1 min, 1% 盐酸酒精分化 3~5 s, 自来水冲洗返蓝 5 min; 再次梯度酒精脱水、二甲苯透明脱蜡, 中性树胶封片, 显微镜观察。

1.2.5 RT-PCR 检测 PRPs mRNA 的表达量 提取总 RNA, 测定总 RNA 的纯度及浓度, 引物序列见表 1。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA 去除基因组 DNA 和反转录得到 cDNA 产物, 去除基因组 DNA 反应条件: 42℃ 2 min, 4℃; 反转录反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃; 使用 TB Green Premix Ex Taq™ II 进行 RT-PCR, 条件: 95℃ 30 s, 1 个循环; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 95℃ 60 s, 65℃ 30 s, 95℃ 1 s, 1 个循环。每个样品做 3 个复孔, 各样品 Ct 值经内参基因标准化后, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算各组 PRPs mRNA 的表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
GAPDH	ACGGCAAGTTCAACGGCACAG	CGACATACTCAGCACCAGCATCAC
PSD95	TCCAGTCTGTGCGAGAGGTAGC	GGACGGATGAAGATGGCGATGG
GluR1	GCTTTTAGATTGCTTTGTCGC	ATGTTGACAGTCCTACGTTTCAT
GluR2	AAGGCTATGGCATCGCAACACC	CAGAGTCCTTGGCTCCACATTAC
CREB	GGAGCAGACAACCGAGAGAGTG	GGCATGGATACCTGGGCTAATGTG
BDNF	TCCTTATGAACCGCCAGCCAATTC	TGGAACCTCGAATGCCGAATAC

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行数据处理, 数据均用均数 ± 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐, 采用 LSD 检验; 若方差不齐, 采用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 染毒期间大鼠的基本情况

对照组大鼠, 饮食饮水正常, 生长状态良好, 体重逐渐增加至 $(475.6 \pm 31.5) \text{ g}$ 。低剂量组大鼠各方面接近对照组, 体重逐渐增加至 $(473.9 \pm 29.1) \text{ g}$, 未见明显异常。中、高剂量组大鼠活动减少, 摄食减少, 体重增加缓慢, 分别为 (468.2 ± 22.7) 、 $(464.4 \pm 21.8) \text{ g}$ 。经统计分析, 各组之间体重差异无统计学意义。

2.2 染铝后大鼠学习记忆能力下降

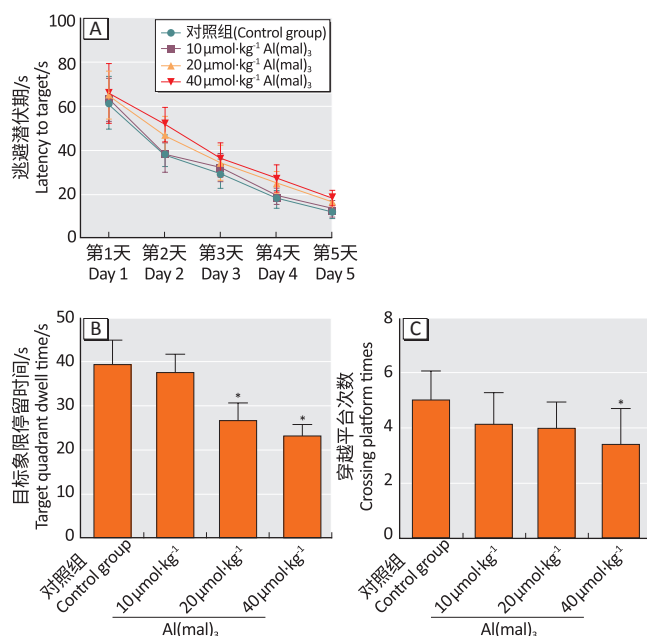
水迷宫结果显示, 随着训练时间的增加, 各组逃

避潜伏期呈下降趋势。与对照组相比,中剂量染铝组大鼠在第3、4、5天的逃避潜伏期分别延长了4.88、7.24、3.92 s,高剂量染铝组在第3、4、5天的潜伏期分别延长了6.41、9.27、6.08 s ($P<0.05$) (图1A)。

空间探索实验结果显示,与对照组相比,第6天中、高剂量染铝组大鼠的目标象限停留时间分别减少了13.21、16.46 s,穿越平台的次数分别减少了0.9、1.6次,见图1B、1C。各组大鼠的典型路径图显示,各组随着训练天数的增加,大鼠寻找平台的路径逐渐清晰,但染铝组大鼠路径仍表现紊乱(图2)。

2.3 染铝后大鼠海马 PRPs 蛋白和 mRNA 水平下降

图3A、3B显示,随着染铝剂量的增加,大鼠海马组织 PRPs (PSD95、GluR1、GluR2、CREB 和 BDNF) 蛋白表达水平逐渐降低。与对照组 (1.00 ± 0.00) 相比,中和高剂量染铝组大鼠海马 PRPs (PSD95: 0.45 ± 0.08 和 0.28 ± 0.06 ; GluR1: 0.38 ± 0.07 和 0.31 ± 0.06 ; GluR2: 0.45 ± 0.08 和 0.33 ± 0.09 ; CREB: 0.58 ± 0.11 和 0.41 ± 0.07 ; BDNF: 0.49 ± 0.03 和 0.33 ± 0.05) 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与中剂量染铝组 (0.45 ± 0.08 和 0.58 ± 0.11) 相比,高剂量染铝组大鼠海马 PSD95 和 CREB (0.28 ± 0.06 和 0.41 ± 0.07) 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。



[注] *: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$.

图1 亚慢性染铝对大鼠逃避潜伏期 (A)、目标象限停留时间 (B)、穿越平台次数 (C) 的影响 ($n=10$)

Figure 1 Escape latency (A), time of staying in target quadrant (B), and times of crossing platform (C) of rats after subchronic aluminum exposure ($n=10$)

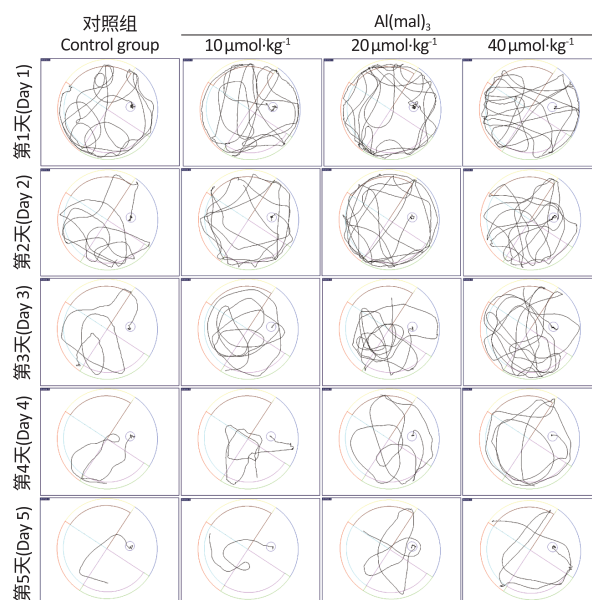
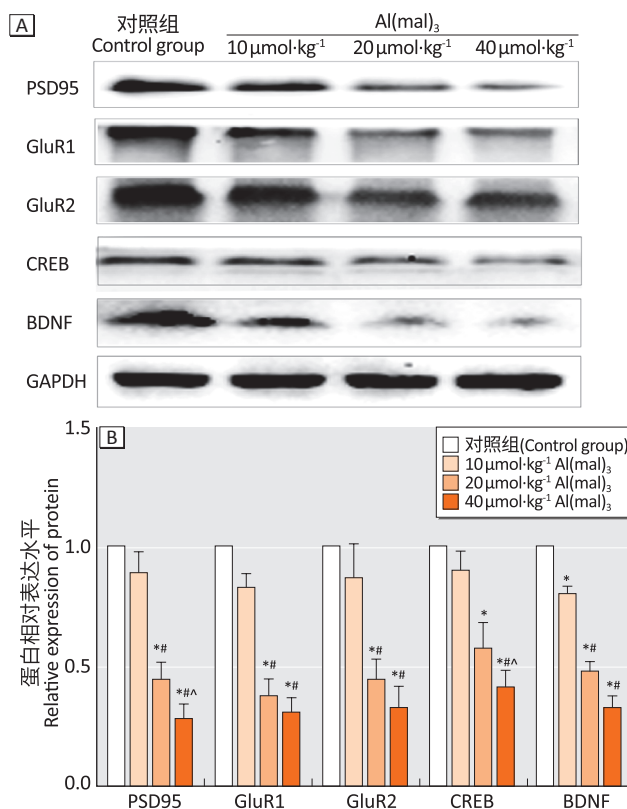


图2 大鼠亚慢性铝染毒后在空间探索实验中的路径图 ($n=10$)

Figure 2 Representative path tracks of rats after subchronic aluminum exposure during spatial exploration trails ($n=10$)



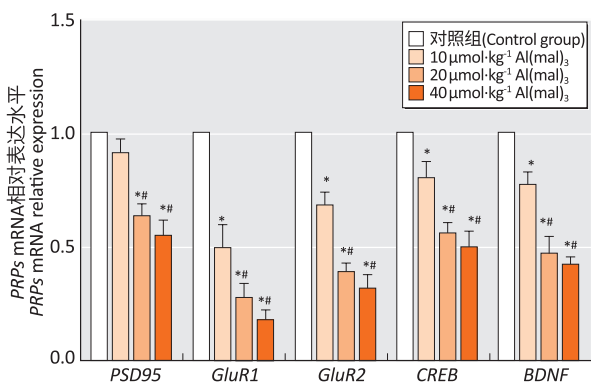
[注] A: 蛋白条带; B: 条带灰度分析。*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与 $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal)₃ 组比较, $P<0.05$; ^: 与 $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal)₃ 组比较, $P<0.05$ 。

[Note] A: Protein bands; B: Grey analysis results. *: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal)₃ group, $P<0.05$; ^: Compared with the $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal)₃ group, $P<0.05$.

图3 亚慢性铝染毒对大鼠海马组织 PSD95、GluR1、GluR2、CREB 和 BDNF 蛋白表达的影响 ($n=10$)

Figure 3 Hippocampal PSD95, GluR1, GluR2, CREB, and BDNF protein expression levels of rats after subchronic aluminum exposure ($n=10$)

图4显示,与蛋白表达结果一致,随着染铝剂量的增加,大鼠海马中 $PRPs$ mRNA表达水平均逐渐降低。其中高剂量染铝组海马 $PSD95$ 和 $CREB$ mRNA与中剂量染铝组相比表达差异不大,但是蛋白表达明显降低($P<0.05$)。



[注] *:与对照组比较, $P<0.05$; #:与 $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组比较, $P<0.05$ 。

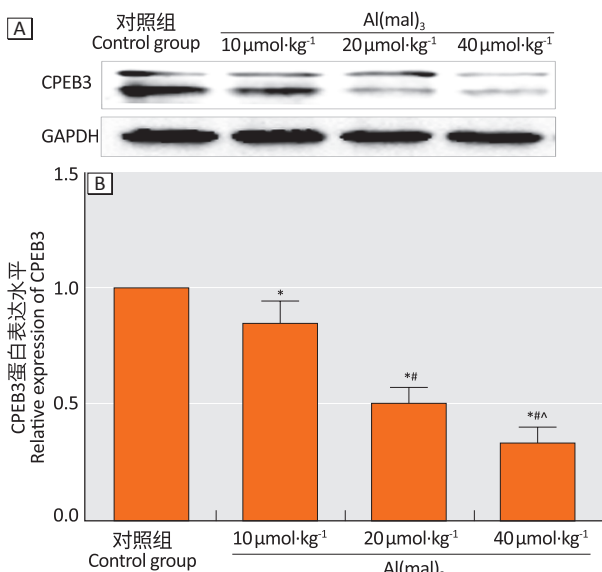
[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, $P<0.05$.

图4 亚慢性铝染毒对大鼠海马组织 $PRPs$ mRNA表达的影响 ($n=10$)

Figure 4 Hippocampal $PRPs$ mRNA expression levels of rats after subchronic aluminum exposure ($n=10$)

2.4 染铝后大鼠海马CPEB3蛋白表达水平降低

图5显示,随着染铝剂量的增加,大鼠海马CPEB3蛋白表达水平逐渐降低。与对照组和低剂量染



[注] A: 蛋白条带; B: 条带灰度分析。*:与对照组比较, $P<0.05$; #:与 $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组比较, $P<0.05$; ^:与 $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组比较, $P<0.05$ 。

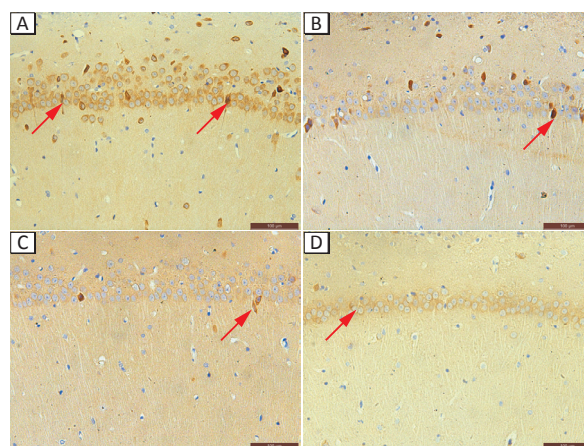
[Note] A: Protein bands; B: Grey analysis results. *: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, $P<0.05$; ^: Compared with the $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group, $P<0.05$.

图5 亚慢性铝染毒对大鼠海马组织CPEB3蛋白表达的影响 (Western blotting, $n=10$)

Figure 5 Hippocampal CPEB3 protein expression levels of rats after subchronic aluminum exposure (Western blotting, $n=10$)

铝组 (1.00 ± 0.00 和 0.85 ± 0.09) 相比,中、高剂量染铝组海马CPEB3蛋白 (0.50 ± 0.06 和 0.33 ± 0.07) 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与中剂量染铝组 (0.50 ± 0.06) 相比,高剂量染铝组海马CPEB3蛋白 (0.33 ± 0.07) 的表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

免疫组化方法检测大鼠海马组织CPEB3蛋白表达,如图6所示,CPEB3主要分布在大鼠海马组织神经元胞质,阳性细胞表现为棕色或褐色着色的细胞(图中红色箭头所示),染色区域增加或着色加深。随着染毒剂量的增加,CPEB3蛋白的阳性细胞表达逐渐减少,且棕褐色区域逐渐变小,着色逐渐变淡。



[注] A:对照组; B: $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组; C: $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组; D: $40\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组。红色箭头指阳性细胞。

[Note] A: Control group; B: $10\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group; C: $20\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group; D: $40\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ group. The red arrows indicate positive cells.

图6 亚慢性铝染毒对大鼠海马组织中CPEB3蛋白表达的影响 (免疫组化法)

Figure 6 Subchronic aluminum exposure induced changes in hippocampal CPEB3 protein expression levels of rats (Immunohistochemistry)

3 讨论

铝是地壳中含量最丰富的金属元素^[14],广泛存在于生产生活的各个方面,通过各种途径进入人体,蓄积于脑组织中,从而对人体产生神经毒性^[15]。本研究 Morris 水迷宫实验结果显示,亚慢性染铝大鼠逃避潜伏期延长,目标象限停留时间和穿越平台的次数缩短,说明 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 损害了大鼠的空间学习和空间记忆能力。

铝的神经毒性核心是学习记忆能力下降,学习和记忆的神经生物学基础是突触可塑性。突触可塑性是指突触的形态和功能可发生较为持久改变的特性或现象,包括结构和功能可塑性^[16-17]。突触可塑性的维

持依赖于大量的突触末端突触可塑性蛋白质的合成。PSD95是突触后膜上重要的脚手架蛋白,主要存在于成熟的兴奋性谷氨酸能突触内^[18],和N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)结合并在突触后膜共聚集,调节兴奋性突触的功能和可塑性^[19]。AMPA介导了中枢神经系统快速兴奋性突触传递,其在突触后膜的动态表达维持长时程增强(long-term potentiation, LTP),对突触可塑性和学习记忆有重要作用^[20-21]。GluR1和GluR2是AMPA的重要组成部分,对突触传递、LTP、长时程抑制(long-term depression, LTD)和空间学习记忆的维持至关重要^[22-23]。CREB是控制长期突触可塑性和长期记忆的核心成分^[24-25],是短期记忆到长期记忆的转换分子,可以介导长时程记忆过程中所需要的新基因转录和蛋白质合成^[26]。BDNF是树突生长的重要因子,调节突触的传递、LTP和蛋白质的翻译,它的降低会损害突触可塑性^[27-28]。以上研究表明这些蛋白均参与突触可塑性的维持,统称为PRPs。研究表明,铝可以降低大鼠海马PSD95和AMPA亚基GluR1和GluR2,抑制AMPA外化,损伤突触可塑性和学习记忆能力^[29-31]。铝暴露抑制大鼠海马CREB,改变突触结构和功能可塑性,导致长期记忆受损^[32-33]。铝降低大鼠海马BDNF蛋白表达,损伤海马的突触可塑性和学习记忆能力^[34]。这与本研究结果一致,染铝后大鼠海马组织中突触可塑性相关蛋白(PSD95、GluR1、GluR2、CREB和BDNF)的表达也明显降低,从而提示铝是通过影响PRPs蛋白的合成从而降低突触的结构和功能可塑性,导致学习记忆能力受损。

为了更进一步阐述CPEB3在突触可塑性下调中的分子机制,本研究检测了染铝大鼠海马组织中CPEB3蛋白的表达情况,结果表明随着染毒剂量的增加,海马组织中CPEB3蛋白表达逐渐下降。而且CPEB3基因敲除小鼠在Morris水迷宫、物体位置识别等实验中记忆明显受损,损害了空间学习记忆能力^[7, 35-36]。因此CPEB3参与了铝致大鼠学习记忆受损的过程。CPEB3蛋白是一种序列特异性的RNA结合蛋白,可以与靶mRNAs特异性结合,通过调控其多聚腺苷酸化水平来调控靶mRNA的翻译过程。研究表明CPEB3主要出现在突触局部,可以通过调控突触局部的突触可塑性蛋白mRNAs的翻译来控制PRPs的合成,作为突触末端的调控突触可塑性蛋白表达的开关分子,参与长时程突触可塑性的维持^[7, 36]。研究表明AMPA(GluR1和

GluR2)和PSD95均为CPEB3调控的靶mRNAs,可以通过mRNA转录后调控,影响蛋白翻译水平。而且敲除CPEB3后,相应靶蛋白明显下降,随之带来学习记忆能力下降^[36-37]。这与本研究结果一致,本研究表明染铝大鼠的海马组织中CPEB3蛋白表达受到抑制,而且伴随着PRPs蛋白和mRNA表达下调。因此推测,作为突触末端的分子开关,CPEB3可能通过调控多种突触可塑性蛋白的翻译来参与铝致突触可塑性下降的分子机制。然而CPEB3的转录后调控和翻译调控非常复杂,在神经系统发挥着重要作用^[38],其分子机制有待于以后更深入的研究。

综上所述,本研究证明亚慢性染铝可以导致大鼠学习记忆能力受损以及突触可塑性蛋白下调,提示其可能通过影响突触可塑性开关分子CPEB3的表达从而抑制海马组织中PRPs的合成,引起学习记忆能力受损。但由于实验方法的局限,本研究并未进一步研究铝是如何影响CPEB3,以及CPEB3如何调节PRPs,这将是本课题组日后的研究方向。

参考文献

- [1] HE S, NIU Q, NIU P, et al. Protective effects of gastrodia elata on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats [J]. Restor Neurol Neurosci, 2008, 26 (6) : 467-473.
- [2] BANKS W A, KASTIN A J. Aluminum-induced neurotoxicity : alterations in membrane function at the blood-brain barrier [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1989, 13 (1) : 47-53.
- [3] YOKEL R A, RHINEHEIMER S S, SHARMA P, et al. Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single ²⁶Al exposure [J]. Toxicol Sci, 2001, 64 (1) : 77-82.
- [4] SONG J, LIU Y, ZHANG H, et al. The RAS/PI3K pathway is involved in the impairment of long-term potentiation induced by acute aluminum treatment in rats [J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29 (11) : 782-789.
- [5] WANG M, CHEN J T, RUAN D Y, et al. The influence of developmental period of aluminum exposure on synaptic plasticity in the adult rat dentate gyrus *in vivo* [J]. Neuroscience, 2002, 113 (2) : 411-419.
- [6] MENDEZ R, RICHTER J D. Translational control by CPEB : a means to the end [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2 (7) : 521-529.
- [7] PAVLOPOULOS E, TRIFILIEFF P, CHEVALEYRE V, et al.

- Neuralized1 activates CPEB3 : a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage [J] . Cell, 2011, 147 (6) : 1369-1383.
- [8] STEPHAN J S, FIORITI L, LAMBA N, et al. The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton [J] . Cell Rep, 2015, 11 (11) : 1772-1785.
- [9] RAYMAN J B, KANDEL E R. Erratum : functional prions in the brain [J] . Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9 (8) : a033597.
- [10] DRISALDI B, COLNAGHI L, FIORITI L, et al. SUMOylation is an inhibitory constraint that regulates the prion-like aggregation and activity of CPEB3 [J] . Cell Rep, 2015, 11 (11) : 1694-1702.
- [11] PEDRAZA N, ORTIZ R, CORNADÓ A, et al. KIS, a kinase associated with microtubule regulators, enhances translation of AMPA receptors and stimulates dendritic spine remodeling [J] . J Neurosci, 2014, 34 (42) : 13988-13997.
- [12] LI H, XUE X, LI L, et al. Aluminum-induced synaptic plasticity impairment via PI3K-Akt-mTOR signaling pathway [J] . Neurotox Res, 2020, 37 (4) : 996-1008.
- [13] Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants : sixty-seventh report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives [M] . Geneva : World Health Organization, 2006 : 33-34.
- [14] JEONG C H, KWON H C, KIM D H, et al. Effects of aluminum on the integrity of the intestinal epithelium : an *in vitro* and *in vivo* study [J] . Environ Health Perspect, 2020, 128 (1) : 017013.
- [15] HOSSEINI S M, HEJAZIAN L B, AMANI R, et al. Geraniol attenuates oxidative stress, bioaccumulation, serological and histopathological changes during aluminum chloride-hepatopancreatic toxicity in male Wistar rats [J] . Environ Sci Pollut Res, 2020, 27 (16) : 20076-20089.
- [16] NGUYEN P V, CONNOR S A. Noradrenergic regulation of hippocampus-dependent memory [J] . Cen Nerv Syst Agents Med Chem, 2019, 19 (3) : 187-196.
- [17] JOSHI V V, PATEL N D, REHAN M A, et al. Mysterious mechanisms of memory formation : are the answers hidden in synapses? [J] . Cureus, 2019, 11 (9) : e5795.
- [18] GREIFZU F, PARTHIER D, GOETZE B, et al. Ocular dominance plasticity after stroke was preserved in PSD-95 knockout mice [J] . PLoS One, 2016, 11 (3) : e0149771.
- [19] KIM E, SHENG M. PDZ domain proteins of synapses [J] . Nat Rev Neurosci, 2004, 5 (10) : 771-781.
- [20] SONG I, HUGANIR R L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity [J] . Trends Neurosci, 2002, 25 (11) : 578-588.
- [21] EARNSHAW B A, BRESSLOFF P C. Biophysical model of AMPA receptor trafficking and its regulation during long-term potentiation/long-term depression [J] . J Neurosci, 2006, 26 (47) : 12362-12373.
- [22] LEE H K, TAKAMIYA K, HAN J S, et al. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory [J] . Cell, 2003, 112 (5) : 631-643.
- [23] STEINBERG J P, TAKAMIYA K, SHEN Y, et al. Targeted *in vivo* mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression [J] . Neuron, 2006, 49 (6) : 845-860.
- [24] MAYFORD M, KANDEL E R. Genetic approaches to memory storage [J] . Trends Genet, 1999, 15 (11) : 463-470.
- [25] YIN J C, DEL VECCHIO M, ZHOU H, et al. CREB as a memory modulator : induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila* [J] . Cell, 1995, 81 (1) : 107-115.
- [26] WANG B, XING W, ZHAO Y, et al. Effects of chronic aluminum exposure on memory through multiple signal transduction pathways [J] . Environ Toxicol Pharmacol, 2010, 29 (3) : 308-313.
- [27] MA Z, LIU K, LI X R, et al. Alpha-synuclein is involved in manganese-induced spatial memory and synaptic plasticity impairments via TrkB/Akt/Fyn-mediated phosphorylation of NMDA receptors [J] . Cell Death Dis, 2020, 11 (10) : 834.
- [28] SOLIMAN F, GLATT C E, BATH K G, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human [J] . Science, 2010, 327 (5967) : 863-866.
- [29] ZHANG H, YANG X, QIN X, et al. Caspase-3 is involved in aluminum-induced impairment of long-term potentiation in rats through the Akt/GSK-3 β pathway [J] . Neurotox Res, 2016, 29 (4) : 484-494.
- [30] SONG J, LIU Y, ZHANG H F, et al. Effects of exposure to aluminum on long-term potentiation and AMPA receptor subunits in rats *in vivo* [J] . Biomed Environ Sci, 2014, 27 (2) : 77-84.
- [31] 高婷, 夏欣宇, 袁春满, 等. 亚慢性染铝对大鼠海马 PSD95 及长时程增强的影响 [J] . 环境与职业医学, 2019, 36

- (11) : 995-1000.
- GAO T, XIA XY, YUAN CM, et al. Effects of subchronic aluminum exposure on PSD95 and long-term potentiation in hippocampus of rats [J]. J Environ Occup Med, 2019, 36 (11) : 995-1000.
- [32] ZHANG L, JIN C, LU X, et al. Aluminium chloride impairs long-term memory and downregulates cAMP-PKA-CREB signalling in rats [J]. Toxicology, 2014, 323 : 95-108.
- [33] BAZZARI FH, ABDALLAH DM, EL-ABHAR HS. Chenodeoxycholic acid ameliorates $AlCl_3$ -induced Alzheimer's disease neurotoxicity and cognitive deterioration via enhanced insulin signaling in rats [J]. Molecules, 2019, 24 (10) : 1992.
- [34] MOHAMED EA, AHMED HI, ZAKY HS, et al. Sesame oil mitigates memory impairment, oxidative stress, and neurodegeneration in a rat model of Alzheimer's disease. A pivotal role of NF- κ B/p38MAPK/BDNF/PPAR- γ pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267 : 113468.
- [35] CHAO HW, TSAI LY, LU YL, et al. Deletion of CPEB3 enhances hippocampus-dependent memory via increasing expressions of PSD95 and NMDA receptors [J]. J Neurosci, 2013, 33 (43) : 17008-17022.
- [36] FIORITI L, MYERS C, HUANG YY, et al. The persistence of hippocampal-based memory requires protein synthesis mediated by the prion-like protein CPEB3 [J]. Neuron, 2015, 86 (6) : 1433-1448.
- [37] SAVTCHOUK I, SUN L, BENDER CL, et al. Topological regulation of synaptic AMPA receptor expression by the RNA-binding protein CPEB3 [J]. Cell Rep, 2016, 17 (1) : 86-103.
- [38] WANG XP, COOPER NG. Characterization of the transcripts and protein isoforms for cytoplasmic polyadenylation element binding protein-3 (CPEB3) in the mouse retina [J]. BMC Mol Biol, 2009, 10 : 109.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)

· 告知栏 ·

喜讯：《环境与职业医学》被EBSCO数据库收录

2021年7月20日,《环境与职业医学》编辑部接到美国EBSCO信息服务部通知,本刊已正式被EBSCO数据库收录。



EBSCO数据库是目前世界上最大的多学科学术期刊数据库和综合性商业资源全文数据库,已经被多个科研机构 and 高校图书馆订购使用,全球83.3%的高校图书馆均将EBSCOhost列为首选的电子文献检索。现已开发400多个在线文献数据库,满足各类型机构的信息需求已达70余年,收录全球各种期刊逾26万种,全球11万5千多家机构选用EBSCO的产品与服务,每天在EBSCO平台上进行的检索达一亿七千五百万次。

《环境与职业医学》由上海市疾病预防控制中心主办,主要着眼于发表环境因素(自然、社会)、职业因素与人群健康的流行病学、毒理学内容的重要研究,以刊登中文文献为主(含英文摘要),月刊。所有被录用的稿件均经过同行专家评议。目前保持CSCD(核心库)、北大核心、科技核心全收录。杂志主页:www.jeom.org。

作为中文期刊,《环境与职业医学》提供700字左右英文长摘要。被EBSCO文献数据库收录,意味着本刊在论文编写格式和数据处理的标准化和规范化要求与国际文献接轨,促进了本刊发表论文的国际化传播力度,可进一步提高作者及其工作单位在国内外的学术地位。

特别感谢支持《环境与职业医学》的各位专家、作者及读者,我们将不忘初心、砥砺前行!

《环境与职业医学》编辑部

2021年7月25日