

镧对断乳后仔鼠大脑皮质 CREB 磷酸化和 BDNF 表达的影响

杨敬华, 刘秋芳, 巫生文, 张立丰, 齐鸣, 鲁帅, 蔡原

摘要: [目的] 研究镧(lanthanum, La)对断乳后仔鼠大脑皮质环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)磷酸化和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响。[方法] 40只成年雌性Wistar大鼠随机分为对照和低、中、高剂量La染毒组,各La染毒组孕鼠产仔后分别饮用0.25%、0.5%和1.0%LaCl₃溶液,其仔鼠断乳前吸吮各自母乳染LaCl₃,断乳后饮用0.25%、0.5%和1.0%LaCl₃染毒1个月,然后进行水迷宫测试,并测定大脑皮质La含量、CREB磷酸化、BDNF mRNA和蛋白表达水平。[结果] 水迷宫测试时,低、中剂量La染毒组仔鼠错误次数和潜伏期明显高于对照组,高剂量La染毒组仔鼠错误次数和潜伏期明显高于对照和低剂量La染毒组。La染毒剂量与仔鼠大脑皮质中的蓄积量呈正相关($r=0.954$)与皮质BDNF mRNA、蛋白表达呈负相关($r=-0.976$, $r=-0.952$)。[结论] La损害断乳后仔鼠的学习记忆能力,其机制可能与La致大脑皮质CREB磷酸化和BDNF基因转录和蛋白表达水平降低有关。

关键词: 镧; 脑; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子

Effects of Lanthanum on CREB Phosphorylation and BDNF Expression in Cerebral Cortex of Rats after Weaning YANG Jing-hua, LIU Qiu-fang, WU Sheng-wen, ZHANG Li-feng, QI Ming, LU Shuai, CAI Yuan (Department of Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China). Address correspondence to CAI Yuan, E-mail: cmuycai@163.com

Abstract: [Objective] To study effects of lanthanum (La) on cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation and brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cerebral cortex of rats after weaning. [Methods] Forty female rats were divided randomly into four groups: control, low-, medium-, and high-dose La-administrated groups. Pregnant rats in La-administrated groups were administrated with 0.25%, 0.5% and 1.0% LaCl₃ in drinking water after delivery, respectively. The offspring of the La-administrated groups were given to LaCl₃ by respective parental lactation before weaning, and then were administrated with 0.25%, 0.5% and 1.0% LaCl₃ in drinking water for one month respectively. Learning and memory of the pups were measured by water maze test. La contents, CREB phosphorylation, BDNF mRNA and protein expression in the cerebral cortex of offspring were also detected. [Results] In the water maze test, the error counts and the latency of the low- and medium-dose La-administrated groups were significantly higher than those of the control group, and the pattern was also observed in the high-dose La-administrated group as compared with the control and the low-dose La-administrated groups. The exposure level of La correlated with the La contents in the cerebral cortex positively ($r=0.954$) but with BDNF mRNA expression and BDNF protein expression negatively ($r=-0.976$, $r=-0.952$, respectively). [Conclusion] La may induce impairments of learning and memory in rats after weaning, which is possibly related to lower levels of CREB phosphorylation, BDNF gene transcription and protein expression caused by La exposure.

Key Words: lanthanum; brain; cAMP response element binding protein; brain derived neurotrophic factor

稀土元素(rare-earth elements)一般分成以镧(lanthanum, La)、铈(cerium, Ce)为代表的轻稀土元素(亦称铈组稀土)和以钇(yttrium, Y)、镥(lutetium, Lu)为代表的重稀土元素(亦称钇组稀土)。根据现有探测结果,我国是稀土资源最多的国

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(编号: 30800925), 辽宁省科
技厅基金资助项目(编号: 2005225008-3)

[作者简介]杨敬华(1977—),女,博士,讲师;研究方向:金属毒理
和神经毒理, E-mail: yjh00123456@sina.com

[通信作者]蔡原教授, E-mail: cmuycai@163.com

[作者单位]中国医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室,辽宁沈阳
110001

家,储量、产量和出口量均居世界首位。稀土元素在我国农业、畜牧业等领域的应用日益广泛,其引发的环境积累问题以及对生态和人体健康的影响不容忽视^[1-2]。近年来,稀土元素对学习记忆等认知能力的影响日益受到关注。人群资料显示,居住于稀土矿区的儿童的智商均数、学习记忆能力均较对照区儿童明显低下^[3-4]。La是自然界中含量较多的稀土元素,且在脑中的蓄积性较强,常用于稀土元素神经毒性研究^[5-7]。结果显示,环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)在学习记忆中发挥关键性作用^[8], CREB的转录调节丝氨酸残基Ser¹³³位点磷酸化是其活化形式。CREB磷酸化后可以诱导脑源性神经营养因子(brain derived

neurotrophic factor, BDNF)的转录表达。BDNF除支持神经元的存活、营养神经外,也参与突触功能和可塑性的调节,在学习记忆中发挥重要作用^[9]。关于La是否影响大脑皮质CREB磷酸化和BDNF表达,目前鲜见报道。因此,本实验拟观察La对断乳后仔鼠学习记忆的影响,并从大脑皮质CREB磷酸化、BDNF基因转录和蛋白表达角度来探讨La影响学习记忆的机制,为进一步研究La等稀土元素的神经毒效应提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

氯化镧(lanthanum chloride, LaCl₃),分析纯,购自中国医药集团化学试剂有限公司;蛋白定量试剂盒,购自中国普利来基因技术有限公司;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒,购自中国大连TaKaRa公司;兔抗大鼠p-CREB抗体、兔抗大鼠BDNF抗体、兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体,购自美国Santa Cruz公司。

1.2 主要仪器

程控水迷宫(SMG-2型,中国医学科学院药物研究所),电感耦合等离子体质谱仪(X-7型,美国Thermo Elemental公司),PCR仪(TGRADIENT96型,德国BIOMETRA公司),垂直电泳仪(DYY-6B型,中国北京六一仪器厂),水平电泳仪(POWER PAC300型,美国BIO-RAD公司),凝胶成像分析系统(GDS800,美国UVP公司)。

1.3 动物分组与染毒

60只Wistar成年大鼠[清洁级,证号:SYXK(辽)2003-0013]由中国医科大学实验动物中心提供,体重(260±10)g,雌雄比例2:1。正式实验前饲养7d,实验动物室温度17~23℃,相对湿度45%~55%,动物饲料由实验动物中心提供。随机将雌鼠分为对照组和低、中、高剂量La染毒组,然后将雌雄大鼠按2:1同笼进行交配,次日晨阴道分泌物镜检有精子者定为受孕,记为妊娠第0天。对照组孕鼠在产仔后饮用蒸馏水,其产仔鼠80只,为对照组仔鼠,断乳前吸吮母乳,断乳后自行饮用蒸馏水;低、中、高剂量La染毒组孕鼠在产仔后分别饮用0.25%、0.50%、1.00%LaCl₃蒸馏水溶液,其产仔鼠数分别为83只、78只和75只,相应为低、中、高剂量La染毒组仔鼠,断乳前吸吮其各自染LaCl₃母乳,断乳后则自行饮用0.25%、0.50%、1.00%LaCl₃蒸馏水溶液,至断乳后1个月结束。每组随机选取8窝(8只孕鼠)的仔鼠,每项指标的检测均从每组取8只仔鼠(雌雄各半),随机从每窝取1只仔鼠。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 神经行为学测试 采用水迷宫试验。所用的水迷宫为一黑色有机玻璃长方体水槽,其中有若干隔板和一固定位置的梯形出口。当仔鼠游至水迷宫各盲端时,电脑判断为错误并自动记录错误次数。直至动物游到梯形出口处的时间为潜伏期。每天训练2轮,每轮训练5次,连续5d。训练结束后间隔1周,再次将仔鼠放于水迷宫内,在相同的条件下测试错误次数和潜伏期,错误次数越多、潜伏期越长说明学习记忆能力越差。

1.4.2 大脑皮质La含量的测定 采用电感耦合等离子体质谱

法。仔鼠麻醉后,用生理盐水全身灌流以消除血液的影响。然后取脑组织,在冰浴上快速切取大脑皮质组织,置于液氮中,然后转存至-80℃低温冰箱内备用。取大脑皮质组织样品50mg,置于Teflon管内,加入65%硝酸2mL和H₂O₂1mL,用Teflon塞密封后置于钢罐中。钢罐密封后在180℃加热4h以消化组织样品。最后用2%(体积分数)硝酸稀释已消化的组织样品至10mL,采用电感耦合等离子体质谱仪测定大脑皮质组织样品中的La含量。

1.4.3 大脑皮质p-CREB、BDNF蛋白含量测定 采用Western Blot法。取大脑皮质组织,提取蛋白,采用酚试剂法进行蛋白定量。取总量相同的蛋白,在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺中电泳,然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,将膜于4℃、5%脱脂奶粉中封闭2h,吐温-三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液[tween-tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline, TTBS]洗3次,兔抗大鼠p-CREB抗体(1:200)、BDNF抗体(1:400)、GAPDH抗体(1:1000)中4℃孵育过夜,TTBS洗3次,室温下二抗中孵育2h。应用底物化学发光(ECL)显示反应产物,曝光,显影,定影。采用图像分析系统进行p-CREB、BDNF表达水平分析,兔抗GAPDH抗体作为内参校正p-CREB、BDNF的相对表达水平。积分灰度值(integrated density value, IDV)代表大脑皮质中蛋白的表达水平。

1.4.4 大脑皮质BDNF mRNA表达水平检测 采用RT-PCR法。取大脑皮质组织,提取总RNA,进行定量与RNA纯度鉴定。用TaKaRa RT-PCR Kit(AMV)Ver.2.1的二步法进行PCR。BDNF引物序列:上游5'-ACACTATTAGCGAGTGGTCAC-3',下游5'-GAACATACGATTGGTAGTCG-3',PCR产物长度222bp;β-肌动蛋白(β-actin)引物序列:上游5'-TTCCACAGATGTGGATCAG-3',下游5'-AGAGAAGTGGGTGGCTTT-3',PCR产物长度406bp。所得产物行琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统进行灰度扫描,β-actin作为内参校正BDNF mRNA的相对表达水平, IDV代表大脑皮质中BDNF mRNA的表达水平。

1.5 统计分析

实验所得数据以“均数±标准差”表示,采用SPSS 13.5统计软件进行统计分析。应用单因素方差分析方法(ANOVA)进行组间差异的假设检验,当组间差异具有统计学意义时,采用q检验(Student Newman Keuls)进行两组间差异的假设检验。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 水迷宫试验中的潜伏期和错误次数

水迷宫测试时,低、中剂量La染毒组潜伏期和错误次数明显高于对照组,高剂量La染毒组潜伏期和错误次数明显高于对照组和低剂量La染毒组,见表1。

2.2 大脑皮质La含量

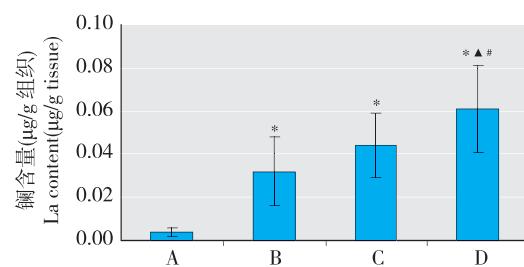
低、中剂量La染毒组仔鼠大脑皮质La含量明显高于对照组,高剂量La染毒组仔鼠大脑皮质La含量明显高于对照组和低、中剂量La染毒组。随着La染毒剂量的增加,La在仔鼠大脑皮质中的蓄积量随之增加。La在仔鼠大脑皮质中的蓄积量与La染毒剂量呈正相关,相关系数r=0.954(P<0.05),见图1。

表 1 各组仔鼠在水迷宫试验中的潜伏期和错误次数(n=8)

组别(Group)	潜伏期(Latency, s)	错误次数(Error count)
对照(Control)	39.00 ± 9.74	1.50 ± 0.93
低剂量 La 染毒组 Low-dose La group	59.13 ± 11.15 [*]	2.63 ± 0.74 [*]
中剂量 La 染毒组 Medium-dose La group	68.13 ± 12.69 [*]	3.13 ± 1.13 [*]
高剂量 La 染毒组 High-dose La group	84.50 ± 26.67 ^{*▲}	4.75 ± 1.28 ^{*▲#}

[注] 低、中和高剂量 La 染毒组仔鼠断乳前吸吮母乳染 LaCl₃，断乳

后饮用 0.25%、0.5% 和 1.0%LaCl₃ 溶液 1 个月(Pups in the low-, medium-, and high-dose La groups were given LaCl₃ by parental lactation before weaning, and then were administrated with 0.25%, 0.5% and 1.0% LaCl₃ in drinking water for one month respectively)。*: 与对照组比(Compared with the control group), P < 0.05; ▲: 与低剂量 La 染毒组比(Compared with the low-dose La group), P < 0.05; #: 与中剂量 La 染毒组比(Compared with the medium-dose La group), P < 0.05。



[注] A: 对照组(Control group); B: 低剂量 La 染毒组(Low-dose La group); C: 中剂量 La 染毒组(Medium-dose La group); D: 高剂量 La 染毒组(High-dose La group)。*: 与对照组比(Compared with the control group), P < 0.05; ▲: 与低剂量 La 染毒组比(Compared with the low-dose La group), P < 0.05; #: 与中剂量 La 染毒组比(Compared with the medium-dose La group), P < 0.05。

图 1 各组仔鼠大脑皮质 La 含量(n=8)

Figure 1 La content in the cerebral cortex of all rat pups

2.3 大脑皮质 p-CREB 蛋白表达水平

低、中剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 p-CREB 蛋白表达水平明显低于对照组, 高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 p-CREB 蛋白表达水平明显低于对照组和低、中剂量 La 染毒组, 见图 2。

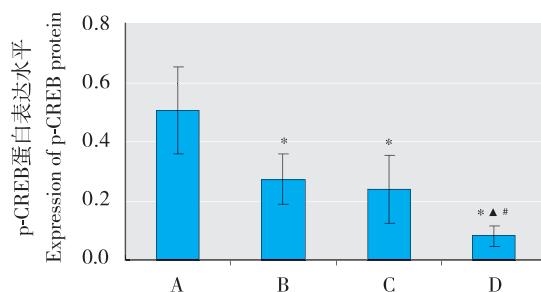
2.4 大脑皮质 BDNF mRNA 表达水平

低、中剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 表达水平明显低于对照组, 高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 表达水平明显低于对照组和低、中剂量 La 染毒组。仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 表达水平与 La 染毒剂量呈负相关, 相关系数 $r = -0.976$ ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 大脑皮质 BDNF 蛋白表达水平

低、中剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF 蛋白表达水平明显低于对照组, 高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF 蛋白表达水平明显低于对照组和低剂量 La 染毒组。仔鼠大脑皮质 BDNF 蛋白表达水平与 La 染毒剂量呈负相关, 相关系数 $r = -0.952$ ($P <$

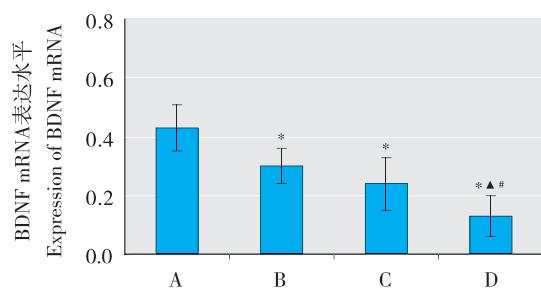
0.05), 见图 4。



[注] A: 对照组(Control group); B: 低剂量 La 染毒组(Low-dose La group); C: 中剂量 La 染毒组(Medium-dose La group); D: 高剂量 La 染毒组(High-dose La group)。*: 与对照组比(Compared with the control group), P < 0.05; ▲: 与低剂量 La 染毒组比(Compared with the low-dose La group), P < 0.05; #: 与中剂量 La 染毒组比(Compared with the medium-dose La group), P < 0.05。

图 2 各组仔鼠大脑皮质 p-CREB 蛋白表达水平(n=8)

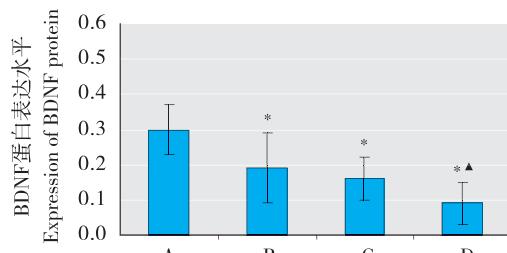
Figure 2 Expression of p-CREB protein in the cerebral cortex of all rat pups



[注] A: 对照组(Control group); B: 低剂量 La 染毒组(Low-dose La group); C: 中剂量 La 染毒组(Medium-dose La group); D: 高剂量 La 染毒组(High-dose La group)。*: 与对照组比(Compared with the control group), P < 0.05; ▲: 与低剂量 La 染毒组比(Compared with the low-dose La group), P < 0.05; #: 与中剂量 La 染毒组比(Compared with the medium-dose La group), P < 0.05。

图 3 各组仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 表达水平(n=8)

Figure 3 Expression of BDNF mRNA in the cerebral cortex of all rat pups



[注] A: 对照组(Control group); B: 低剂量 La 染毒组(Low-dose La group); C: 中剂量 La 染毒组(Medium-dose La group); D: 高剂量 La 染毒组(High-dose La group)。*: 与对照组比(Compared with the control group), P < 0.05; ▲: 与低剂量 La 染毒组比(Compared with the low-dose La group), P < 0.05。

图 4 各组仔鼠大脑皮质 BDNF 蛋白表达水平(n=8)

Figure 4 Expression of BDNF protein in the cerebral cortex of all rat pups

3 讨论

在本研究中, La 染毒造成其在仔鼠大脑皮质中明显蓄积, 其中高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质中 La 的蓄积量达到每 g 组织 0.061 μg。而且 La 在仔鼠大脑皮质的蓄积量与 La 染毒剂量呈明显正相关, 这与任丽宝等^[10]的研究结果相一致, 即轻稀土元素可以蓄积在大鼠脑组织内, 其含量随受试动物摄入量增加而逐渐增高, 存在一定的量效关系。La 在脑组织中蓄积, 构成 La 影响脑组织结构和功能的基础。水迷宫试验等神经行为学测试是评价啮齿类动物认知功能的常用指标。本研究显示, La 染毒组仔鼠在水迷宫测试中的潜伏期和错误次数高于对照组, 其中高剂量 La 染毒组仔鼠在水迷宫测试中的潜伏期和错误次数分别较对照水平增高了 1.2 倍和 2.2 倍, 具有一定的剂量-反应关系。可见随 La 染毒剂量的增加, 受试动物学习记忆受损害的程度加大。

目前 La 损害学习记忆的机制尚未阐明。CREB 是一种转录因子, 具有调节包括学习记忆在内的广泛的生物学功能, 是细胞内多种信号通路的一种关键成分, 尤其是在学习记忆和突触可塑性形成过程中发挥着关键性作用^[11-12]。在本研究中, La 染毒组仔鼠大脑皮质 p-CREB 的表达水平明显低于对照组, 低、中、高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 p-CREB 的表达水平分别降低至对照水平的 54%、48%、16%, 可见在本实验条件下, 仔鼠大脑皮质 CREB 的磷酸化(活化)低于对照水平。BDNF 作为神经营养因子家族的成员之一, 其启动子区内含 cAMP 反应元件(cAMP response element, CRE)序列。活化的磷酸化形式的 CREB 与 BDNF 的 CRE 序列结合, 启动 BDNF 基因的转录以及随后的蛋白表达。BDNF 主要分布在大脑皮质、海马、小脑等部位, 支持包括中脑多巴胺神经元、胆碱能神经元、纹状体 γ-氨基丁酸(GABA)能神经元、感觉和运动神经元在内的多种神经元的存活, 对于突触可塑性以及神经元轴突与树突形态的发育和维持也具有重要作用^[13-14]。BDNF 参与记忆的巩固过程, 被认为是学习记忆形成过程中的关键蛋白之一^[15]。在本研究中, 低、中剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显低于对照水平, 高剂量 La 染毒组仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显低于对照组和低剂量 La 染毒组, 分别降低至对照水平的 30%、31%, 且仔鼠大脑皮质 BDNF mRNA 和蛋白表达水平与 La 染毒剂量呈负相关, 相关系数分别为 -0.976 和 -0.952, 说明 La 染毒以剂量依赖的方式降低大脑皮质 BDNF mRNA 和蛋白表达水平, 进而引起 BDNF 的生物学作用降低, 无法正常参与突触功能和可塑性的调节, 从而在 La 致学习记忆能力损害中发挥一定的作用。

综上所述, La 损害断乳后仔鼠的学习记忆能力, 其机制可能与 La 致大脑皮质 CREB 磷酸化和 BDNF 基因转录和蛋白表达水平降低有关, 但相关的密切机制尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈祖义. 稀土的 hormesis 效应及其农用对农业生态环境的潜在影响[J]. 农村生态环境, 2004, 20(4): 1-5.
- [2] 王洋, 聂留旺, 陈启龙. 稀土元素的生物安全性探讨[J]. 生物学杂志, 2004, 21(2): 4-6.
- [3] 朱为方, 徐素琴, 张辉, 等. 稀土区儿童智商调查研究—I. 赣南稀土区生物效应研究[J]. 科学通报, 1996, 41(10): 914-916.
- [4] 范广勤, 袁兆康, 郑辉列, 等. 儿童稀土暴露的健康效应研究[J]. 卫生研究, 2004, 33(1): 23-28.
- [5] 陈祖义. 稀土元素的脑部蓄积性、毒性及其对人群健康的潜在危害[J]. 农村生态环境, 2005, 21(4): 72-73, 80.
- [6] HE X, ZHANG Z, ZHANG H, et al. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats[J]. Toxicol Sci, 2008, 103(2): 354-361.
- [7] CHE Y, CUI Y, JIANG X. Effects of lanthanum chloride administration in prenatal stage on one-trial passive avoidance learning in chicks[J]. Biol Trace Elem Res, 2009, 127(1): 37-44.
- [8] MIZUNO M, YAMADA K, MAEKAWA N, et al. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning[J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 135-141.
- [9] YAMADA K, MIZUNO M, NABESHIMA T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory[J]. Life Sci, 2002, 70(7): 735-744.
- [10] 任丽宝, 王小燕, 解清, 等. 大鼠脑组织中轻稀土元素含量相关性研究[J]. 分析试验室, 2007, 26(7): 108-111.
- [11] SHAYWITZ AJ, GREENBERG M E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals [J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68: 821-861.
- [12] MIYAMOTO E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100(5): 433-442.
- [13] LU B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation[J]. Learn Mem, 2003, 10(2): 86-98.
- [14] LU Y, CHRISTIAN K, LU B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory[J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 89(3): 312-323.
- [15] LEE JL, EVERITT BJ, THOMAS KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation[J]. Science, 2004, 304(5672): 839-843.

(收稿日期: 2010-07-16)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)