

急、慢性铅中毒对海马 CA1 区长时程增强和活化的细胞外信号调节激酶 2 影响

杨菁¹, 孙黎光^{1*}, 蔡葵², 宗志宏¹, 邢伟¹, 刘素媛¹, 刘宁¹

(中国医科大学 1. 基础医学院生物化学教研室, 2. 脑研究所神经生理研究室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨急、慢性铅中毒对大鼠海马活化的细胞外信号调节激酶 2(ERK2)含量的影响及其与海马 CA1 区长时程增强(LTP)的关系。方法 大鼠怀孕后分别饮用蒸馏水或 0.2% 醋酸铅溶液, 断乳后鼠仔则直接饮用, 于 30 d 后测定 LTP, 并取海马作为慢性铅中毒标本测定 ERK2 含量。正常 30 d 大鼠海马片稳定培养 2 h 后, 分别用含或不含 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅的人工脑脊液孵育, 不同时间点收集, 作为急性铅中毒标本测定 ERK2 含量。用 Western 印迹法测定标本活化的 ERK2 含量。结果 高频刺激后对照组和慢性铅中毒组峰电位分别为刺激前的 185% 和 88%; 慢性铅中毒组活化的 ERK2 则比对照组降低了 46%。海马片培养中, 对照组活化的 ERK2 含量基本保持不变, 铅中毒组在 30 和 60 min 时分别下降了 68% 和 33%, 120 min 后恢复到正常水平。结论 活化的 ERK2 含量降低可能是铅中毒致使 CA1 区 LTP 不能形成的原因之一。

关键词: 铅; 海马; 蛋白激酶类; 长时程增强

中图分类号: R995

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0066-05

铅是环境中主要的污染因素。铅暴露, 尤其是发育期, 可引起智力缺陷和行为异常, 但其机制至今尚无共识^[1]。海马是大脑学习记忆的关键部位, 长时程增强(long term potentiation, LTP)则是学习记忆中必不可少的组成部分^[2], 因此研究铅抑制 LTP 形

成机制具有重要的意义。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是信号从细胞表面传导到细胞核的重要传递者。涉及细胞生长、分裂、死亡等多种细胞生理功能。目前, 在哺乳动物细胞已鉴定出 4 条 MAPK 信号传导通路: ERK1/2(p44 MAPK/p42 MAPK), JNK, P38, ERK5 通路。现有研究表明细胞外信号调节激酶 2(extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2)在 LTP 及学习记忆中具有重要作用^[3]。急、慢性铅中毒对海马 LTP 的影响现已多有报道^[1,4]。但急、慢性铅中毒对 ERK2 的影响却鲜见报道。本文通过检测海马活化的 ERK2 含量来探讨铅干扰 LTP 及影响学习记忆的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠, 体重 300 ~ 350 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。兔磷酸化 ERK2 多克隆抗体, 购于 Promega 公司; 辣根过氧化酶标记的山羊抗兔二抗, 购于北京中山生物技术有限公司; 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 购于 Sigma 公司; 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、乙二醇双四乙酸(ethyleneglycol bis tetraacetic acid, EGTA)购于华美生物工程公司。UP 50H 型超声波细胞破碎仪为 Gehrte Sicherheit 公司产品。

1.2 动物分组

健康成年雌性 Wistar 大鼠受孕后即分成 2 组, 一组饮用蒸馏水为对照组; 另一组饮用 0.2% 醋酸铅溶液, 为慢性染铅组。各自持续整个妊娠期和哺乳期。为确保相同营养条件, 每窝只保留幼鼠 8 只, 于 21 d 断乳, 对照组新生大鼠改为直接饮用蒸馏水, 慢性染铅组新生大鼠开始饮用 0.2% 醋酸铅溶液。出生后 30 d, 两组交替进行 LTP 测定。

1.3 慢性铅中毒长时程增强测定

采用时利德等^[5]方法测定海马 CA1 区 LTP, 但

收稿日期: 2003-04-11 接受日期: 2003-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970651)

作者简介: 杨菁(1968-), 男, 辽宁人, 理学博士生, 从事神经毒理学及信号转导研究。

* 联系作者 E-mail: ydsgl@163.com Tel: (024) 23256666-5297 Fax: (024)23281549

电极位置不同,刺激电极插入前囟后 2.8 mm,右侧旁开 2.8 mm,皮质下 3.0 mm 处;记录电极为前囟后 2.8 mm,右侧旁开 1.2 mm,皮质下 1.5 mm。

高频刺激后,用单脉冲刺激检验诱发的峰电位(population spike, PS)幅值变化及变化维持的时间,如 PS 的平均幅值高于或低于基线值,变化 > 10%,统计学处理有意义,并维持 > 30 min,高者定义为 LTP,低者定义为长时程抑制(long term depression, LTD)。

1.4 慢性海马脑片标本制备

LTP 测定后,大鼠颈部脱臼,迅速取出海马,放入液氮中,此为慢性铅中毒或对照组海马样品。

1.5 急性海马脑片标本的制备^[4]

出生 30 d 健康大鼠,颈部脱臼法处死,迅速取出海马,放入预冷的人工脑脊液(ACSF, mmol·L⁻¹: NaCl 124, KCl 4.4, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.3, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26, 葡萄糖 10)中。将海马横切为 350 μm 脑片放到 6 孔培养板中,分为对照组和铅中毒组。用预先通以 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体的 ACSF 灌流,流速 1 mL·min⁻¹;温度 32.5 ~ 33.5℃。稳定 2 h 后,铅中毒组改用含 20 μmol·L⁻¹ 醋酸铅的 ACSF 灌流。醋酸铅加入培养板时间计时为 0 min。分别于 0, 3, 7.5, 15, 30, 60, 120 min 收集脑片,此为急性铅中毒海马样品;对照组始终 ACSF 灌流并与急性铅中毒组同一时间收集脑片。

将培养的脑片放到 0.5 g·L⁻¹ MTT 中室温观察 15 min,如颜色由白变黑则证明存活^[6]。在所有脑片收集完成后剩余的脑片仍然存活则保留所收集的样品,否则弃之不用。

1.6 活化的 ERK2 含量测定^[7]

将收集到的海马脑片样品立即放到预冷的裂解缓冲液中。4℃超声粉碎后,17 000 × g 离心 1 h,取上清分装。用 Bradford 测定蛋白质含量,用牛血清白蛋白为标准。用 10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质,每孔蛋白含量为 20 μg。用磷酸化抗体,常规 Western 印迹法测定活化的 ERK2 含量。将蛋白印迹显影图扫描,再利用 ChemiImager 5500 V2.03 图像分析软件对实验结果进行分析,灰度值代表酶含量,以对照组酶含量为 1,铅中毒组与其对比。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;用 SPSS 10.0 软件统计包进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 高频刺激前后海马 CA1 区峰电位幅值比较

高频刺激前,对照组 PS 基线值为(0.95 ± 0.38) mV,铅中毒组为(1.13 ± 0.48) mV;两者比较无显著性差异(*n* = 6, *P* > 0.05)。高频刺激后,对照组的 PS 幅值明显升高(图 1),平均为刺激前的 1.85 倍;而铅中毒组 PS 下降到刺激前的 88%。两组在同一时间的 PS 值进行对比具有显著性差异。

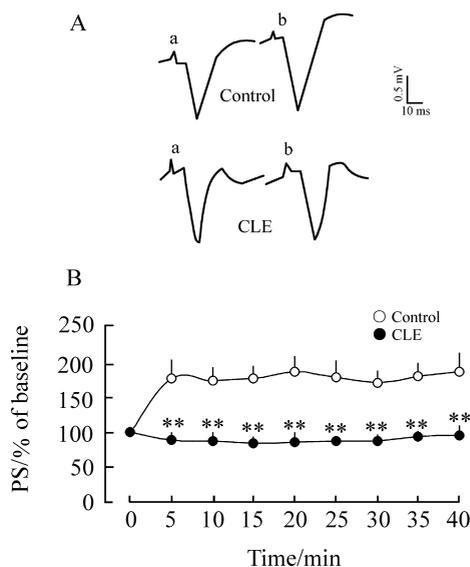


Fig 1. Effects of chronic lead exposure (CLE) on the expression of long term potentiation in rats. A: examples of original traces of population spike (PS) recoding from rats of control and CLE in 5 min before (a) and 20 min after (b) high frequency stimulant (HFS). B: defined the average of PS before HFS as 100%. $\bar{x} \pm s$, *n* = 6. ** *P* < 0.01, compared with corresponding control.

2.2 慢性铅中毒对海马活化 ERK2 含量的影响

本法可同时检测活化的 ERK1(分子量 44 ku)和 ERK2(分子量 42 ku),ERK1 与本实验关系不大,故未进行结果计算。以对照组活化的 ERK2 含量为 1,则慢性铅中毒组为 0.54 ± 0.02,与对照组相比具有显著性差异(*n* = 3, *P* < 0.01, 图 2)。

2.3 急性铅中毒对海马活化 ERK2 含量的影响

图 3 结果以各组 0 min 时的灰度值为 1,以后各时间点均以其为基准进行对照。可以看出醋酸铅 20 μmol·L⁻¹灌流 3 ~ 120 min,活化的 ERK2 含量在 30 min 明显下降,1 h 开始有所回升,到 2 h 基本回

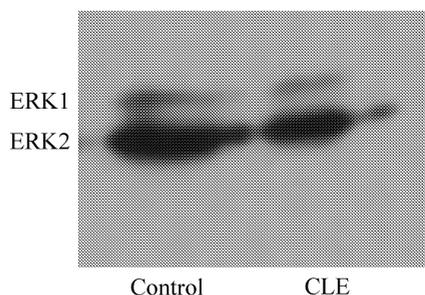


Fig 2. Active ERK2 in hippocampus treated with chronic lead exposure, determined by Western blots.

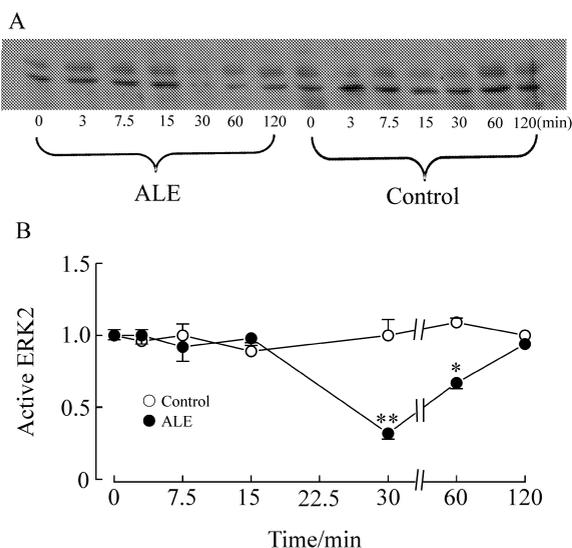


Fig 3. Active ERK2 in hippocampal slices treated with acute lead exposure (ALE), determined by Western blots. A. example of ALE and control of active ERK2 in hippocampal slices determined by Western blots. B. defined every group 0 min active ERK2 as 1, other time point compared with it. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with corresponding time point of control.

到正常水平。而对照组活化的 ERK2 含量基本没有变化。

3 讨论

海马是大脑学习记忆的关键部位, LTP 则被认为是学习记忆重要的电生理指标^[2], 它是突触活动的易化现象, 包括诱导和维持两个过程。不同部位及刺激所诱导的 LTP 有不同的神经机制。研究显示

海马的 CA1-CA2 和 CA3 区对学习记忆非常重要。在空间记忆的行为训练中 ERK2 的磷酸化局限到 CA1/CA2 区神经元^[8]。基因改变的小鼠显示在 CA1 区不能诱导 LTP, 同时也显示空间记忆缺失, 然而 CA3 区或齿状回不能诱导 LTP 则对空间记忆没有影响^[9]。铅中毒可导致空间记忆损伤, 故选定 CA1 区 LTP 为测定指标。结果表明在高频刺激前对照组和染铅组的 PS 幅值无明显差异; 而高频刺激后, 染铅组的幅值较对照组明显降低, 甚至诱导后的 PS 幅值比诱导前还低, 即引起了 LTD, 是铅抑制 LTP 的表现形式, 与报道相似^[4]。

为进一步探讨铅抑制 LTP 的机制, 作者对慢性铅中毒海马活化的 ERK2 含量进行了测定, 结果发现活化的 ERK2 含量下降了 46%, 与对照组相比较有明显差异。已有文献证明 ERK2 通路在海马 LTP 中起非常重要作用^[3]。高频刺激后可以引起 CA1/CA2 区活化的 ERK2 不包括 ERK1 含量升高, 并证明该升高是依赖 NMDA 受体的^[10]; 预先用 PD098059 和 U0126^[11]抑制 ERK2 的激活则大鼠 LTP 不能形成和空间学习记忆的损害。因此, 作者认为铅中毒导致的海马活化的 ERK2 含量降低是 LTP 抑制和空间学习受损的可能机制之一。同时作者又测定了急性铅中毒海马脑片活化的 ERK2 含量, 结果表明急性铅中毒组在 30 min 时 ERK2 含量达到最低, 1 h 逐渐升高, 2 h 基本回到正常水平。Hussain 等^[1]在相同的实验条件下, 于 30 min 时测定了 LTP, 结果显示 CA1 区 LTP 不能形成。因此, 活化的 ERK2 含量下降也可能是导致急性铅中毒后 LTP 不能形成的原因之一。

铅可以通过对其上游信号分子作用来对 ERK2 进行调节^[12], 一是蛋白激酶 C(PKC)可通过 Ras→Raf-1→MEK 途径(Ras 途径); 其二是蛋白激酶 A(PKA)通过 Rap-1→B-Raf→MEK 途径(Rap 途径)来调节 ERK。而铅对 PKC^[13]和 PKA^[14]的抑制作用均有报道。

同时作者注意到, 慢性铅中毒组大鼠的高频刺激后 PS 幅值下降幅度比文献报道的 ERK 抑制剂的还大, 这进一步说明铅中毒导致的 LTP 抑制不仅仅是作用于 ERK2 这一点引起的, 而是 NMDA 受体、PKC 等多位点综合作用引起的。

本实验结果同时也提出了新问题, 如急性铅中毒后 2 h 活化的 ERK2 含量回到正常水平, 此时是否能够诱导形成 LTP? 机制是什么? 这些问题均有待

于进一步探讨。

4 参考文献:

- [1] Hussain RJ, Parsons PJ, Carpenter DO. Effects of lead on long-term potentiation in hippocampal CA3 vary with age [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000, **121**(2):243 – 252.
- [2] Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2000, **23**:649 – 711.
- [3] Adams JP, Sweatt JD. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, **42**:135 – 163.
- [4] Carpenter DO, Hussain RJ, Berger DF, Lombardo JP, Park HY. Electrophysiologic and behavioral effects of perinatal and acute exposure of rats to lead and polychlorinated biphenyls[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, **110**(Suppl 3):377 – 386.
- [5] She LD, Chai K, Teng GX, Wan BJ, Sun LG. Chronic lead exposure impairs *in vivo* induction of long term potentiation in young rat hippocampal dentate gyrus[J]. *Chin J Appl Physiol*(中国应用生理学杂志). 1998, **14**(1):82 – 86.
- [6] Connelly CA, Chen LC, Colquhoun SD. Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices[J]. *J Neurosci Methods*, 2000, **99**(1 – 2):1 – 7.
- [7] Kanterewicz BI, Urban NN, McMahon DB, Norman ED, Giffen LJ, Favata MF, *et al.* The extracellular signal-regulated kinase cascade is required for NMDA receptor-independent LTP in area CA1 but not area CA3 of the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(9):3057 – 3066.
- [8] Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(9):3535 – 3544.
- [9] Nosten-Bertrand M, Errington ML, Murphy KP, Tokugawa Y, Barboni E, Kozlova E, *et al.* Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1[J]. *Nature*, 1996, **379**(6568):826 – 829.
- [10] English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation[J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(31):19103 – 19106.
- [11] Selcher JC, Weeber EJ, Christian J, Nekrasova T, Landreth GE, Sweatt JD. A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1 [J]. *Learn Mem*, 2003, **10**(1):26 – 39.
- [12] Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieck C, Sweatt JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(11):4337 – 4348.
- [13] Hou WJ, Sun LG, Zhu QW, Wu Z, Liu SY, Xing W. Relationship between lead and protein kinase C of brain and memory in rats[J]. *J Health Toxicol*(卫生毒理学杂志), 2002, **16**(2):113 – 115.
- [14] Ruan DY. Molecular mechanism of lead affect learning and memory in children[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 1997, **11**(2):97 – 98.

Effect of acute and chronic lead exposure on CA1-long term potentiation and active extracellular signal-regulated kinase 2 of rat hippocampus

YANG Jing¹, SUN Li-Guang^{1*}, CAI Kui², ZONG Zhi-Hong¹, XING Wei¹, LIU Su-Yuan¹, LIU Ning¹
(1. Department of Biochemistry, Basic Medical College, 2. Department of Neurophysiology, Brain Research Institute, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: AIM To investigate the effect of acute and chronic lead exposure on CA1 long term potentiation(LTP) and active extracellular signal-regulated kinase 2(ERK2) of rat hippocampus. **METHODS** For chronic lead exposure *in vivo*, pregnant female rats were given 0.2% lead ac-

etate in their drinking water before breeding and throughout gestation and lactation. After weaning at postnatal 21 d, the pups were provided 0.2% lead acetate in drinking water. Until 30 d, two group rats alternatively were determined LTP and hippocampus was got as a chronic sample. For

acute lead exposure *in vitro*, the rat brain was quickly removed and immersed in ice-cold culture medium bubbled with 95% O₂ + 5% CO₂, and 350 μm hippocampal slices were prepared. After 2 h stabilization, 20 μmol·L⁻¹ lead acetate was added into the media, the slice was collected at different time(3, 7.5, 15, 30, 60, 120 min). The control group in acute or chronic experiments used water instead of lead acetate. The content of active ERK2 was determined by Western blots. **RESULTS** After the application of the high frequency stimulant, the control group population spike increased in relation to baseline amplitude to 185%, while chronic lead exposure group decreased to 88%. In chronic experiment, the lead

results in active ERK2 content decreased to 54%. In acute experiment, active ERK2 content decreased remarkably at 30 and 60 min, and returned to normal level at 120 min, while control group had no obvious changes. **CONCLUSION** Chronic lead exposure inhibits LTP induction and expression; the mechanism of this inhibition might be related to the decreased active ERK2.

Key words: lead; hippocampus; protein kinases; long term potentiation

Foundation item: The project supported by the National Natural Science Foundation of China(39970651)

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)

欢迎订阅 2004 年《国外医学药学分册》

《国外医学药学分册》为全国中文核心期刊(药学类)、中国生物医学核心期刊、《中文科技资料目录》来源期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊。本刊主要报道国外天然药、合成药和生物制品等的药理学、药剂学、药物分析、临床药理和毒理等方面的新进展、新技术、新成果及医药信息。读者对象主要是从事药学研究的科技人员、临床医师和药师、制药工程技术人员、医药院校师生等。

本刊国内外公开发行,双月刊,大 16 开本,64 页,每期定价 8.00 元。国内邮发代号:82-135;国外代号:BM6568,国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)。欢迎广大读者在当地邮局订阅。

编辑部地址:北京市太平路 27 号;邮编:100850;电话:010-66931618;E-mail:guol@nic.bmi.ac.cn