

# 锂对铅引起的大鼠海马 CA1 区长时程增强效应 (LTP) 损伤的修复作用

钟桂生, 姚颖, 阮迪云

(中国科学技术大学生命科学学院, 安徽 合肥 230027)

**摘要:** 应用离体脑片记录技术, 记录大鼠海马 CA1 区的兴奋性突触后电位 (EPSPs), 研究了锂对铅引起的大鼠海马 CA1 区长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP) 损伤的修复作用。结果表明: 对照组大鼠海马 CA1 区 LTP 幅度为  $194.42 \pm 14.05\%$  ( $n=10$ ); 铅处理组 LTP 的幅度为  $147.06 \pm 9.55\%$  ( $n=13$ ); 而锂加铅处理组 LTP 的幅度为  $193.45 \pm 14.91\%$  ( $n=15$ )。与对照组相比, 铅处理组 LTP 的幅度降低了 47.36%, 而锂几乎完全修复了铅对大鼠海马 CA1 区 LTP 幅度的损伤。锂和铅处理后对大鼠海马 CA1 区的双脉冲易化 (paired-pulse facilitation, PPF) 都有一定的抑制作用, 在脉冲间隔为 50 ms 时, 这种抑制效应最大: 对照组为  $155.58 \pm 6.35\%$  ( $n=7$ ); 铅暴露组为  $150.26 \pm 13.74\%$  ( $n=8$ ); 锂加铅处理组为  $140.59 \pm 15.42\%$  ( $n=8$ )。结果表明: 锂对铅引起大鼠海马 CA1 区 LTP 的损伤有一定的修复作用。

**关键词:** 锂; 铅; 海马脑片; 长时程增强效应 (LTP)

中图分类号: Q424 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2002)03-0293-04

铅作为一种环境毒物和神经毒物, 能够损伤儿童及婴儿的智力发育和认知功能<sup>[1,2]</sup>。大量研究表明, 发育早期低浓度铅暴露与儿童乃至成年人的神经行为及认知功能的损伤有直接的联系<sup>[3,4]</sup>。如果儿童的血铅浓度在 100–150  $\mu\text{g/L}$  时, 发育的大脑就会出现功能性损伤, 在啮齿类动物中, 如果血铅浓度在 100–200  $\mu\text{g/L}$  也会出现同样现象<sup>[2,5]</sup>。进一步的研究发现铅暴露后海马组织铅的浓度明显高于其他脑区<sup>[6]</sup>。长时程增强效应 (LTP) 作为突触可塑性变化的重要形式, 被认为是学习记忆的一种可能机制和度量指标<sup>[7]</sup>。慢性铅暴露降低了大鼠海马 CA1 区 LTP 的幅度, 损伤了突触可塑性<sup>[8]</sup>。

我国铅污染问题依然十分严重, 但防治儿童铅中毒药物的研究很少。近年来, 锂的生物学作用正在逐步为人们所认识。锂的神经营养和神经保护作用也逐步为大量实验所证实<sup>[9]</sup>。锂可以保护小脑颗粒细胞, 阻止其凋亡。锂还可以保护神经元, 免受谷氨酸、神经酰胺的损伤。

本文采用离体脑片记录技术, 研究锂盐对慢性铅暴露引起的神经损伤的修复作用, 探讨锂盐恢复铅引起的大鼠海马 CA1 区 LTP 损伤的机制, 为研制有效驱铅药物提供了理论上的依据。

## 1 材料和方法

动物准备, 海马铅含量的测量和脑片的制备方法详见文献[8,10], 在此仅作简要的介绍。

### 1.1 动物准备

将怀孕的 Wistar 大鼠随机分为三组: 对照组、铅暴露组和锂加铅处理组。自新生幼鼠出生后第一天 (即第 0 天) 起, 给铅暴露组和锂加铅处理组母鼠每天喂 0.2% 的醋酸铅溶液 2 ml, 幼鼠经母乳摄入铅。每窝幼鼠性别、只数相等, 室温保持在 18–22°C, 一直到幼鼠 21 天断奶为止。对照组喂 2 ml 的蒸馏水, 21 天后断奶, 除去母鼠, 大鼠分窝正常饲养, 其中锂加铅处理组每天喂 3  $\mu\text{g/g}$  剂量的氯化锂, 喂养 10 天后做离体实验。

### 1.2 脑片的制备

收稿日期: 2002-03-21

基金项目: 中国科学院创新项目 (KZCX2-410); 国家自然科学基金项目 (30170809, 30000039); 教育部博士点基金项目 (1999035811); 中国科大基金项目 (KY1504, KY1206)

作者简介: 钟桂生, 1977 年生, 硕士生

通讯作者: 阮迪云, Fax: (0551)3601442, E-mail: ruandy@ustc.edu.cn

将大鼠 (31-33d) 在清醒的状态下断头, 快速取全脑放入 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气饱和的 4℃ 人工脑脊液中 (人工脑脊液的组成是(mmol/L): NaCl 124, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, 葡萄糖 10. pH=7.30-7.35)。待脑组织冷却后快速剥离海马, 沿海马槽纤维平行方向将海马切成 350-400 μm 厚的脑片, 将脑片移至预先通以 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气的人工脑脊液中, 室温下孵育 1-2 h。将孵育后的脑片移至脑片灌流小室, 灌流速度为 1 ml/min, 并在脑片上方通入 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 的混合气。灌流小室的温度为 (35± 0.5)℃, 在脑片稳定 30 min 后开始记录。刺激电极置于 Schaffer 侧支, 记录电极是充以人工脑脊液的玻璃微电极, 尖端直径为 1-3 μm, 将记录电极插入 CA1 区锥体细胞树突层 100-200 μm 处, 记录的电活动是 Schaffer 侧支 -CA1 区锥体细胞的场兴奋性突触后电位 (fEPSPs)。

**1.3 LTP 和 PPF 记录**

LTP 的诱导是先用条件刺激 (刺激波形的波宽为 0.2 ms, 频率为 0.05 Hz 的恒流方波) 采集 20 min, 作为平均的基值 (100%), 然后施加高频刺激 (100 Hz, 1 s, HFS)。高频刺激后, 用条件刺激稳定记录 50 min, 得到 LTP。LTP 计算方法: 将 HFS 后 45-60 min 的 EPSP 幅度叠加平均值与 HFS 前基值的比值计为 LTP 的幅度。脑片稳定记录 20 min 后, 施加双脉冲刺激方波, 脉冲间隔为 10-150 ms。PPF 计算方法: 将第二个 EPSP 的斜率数值与第一个 EPSP 的斜率数值的比值计为 PPF 的幅度。

**1.4 统计方法**

EPSP 的大小以反应波形的起始斜率度量, 数据以平均数± 平均标准误差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用 *t* 检验, *P*<0.05 被认为有显著性差异。

**2 结 果**

**2.1 大鼠海马组织铅浓度的测定**

在出生后 32 天时取出海马组织, 经消化处理, 制备成样品, 用 VG, element, PlasmaQuad 3 电感耦合等离子体质谱仪测定海马组织中的铅浓度。结果如下: 对照组海马组织中铅的浓度为 (1.54± 0.04) μg/g (*n*=7); 铅暴露组为 (3.32± 0.07) μg/g (*n*=8); 锂加铅处理组: (3.21± 0.08) μg/g (*n*=8)。结果表明, 铅暴露使大鼠海马

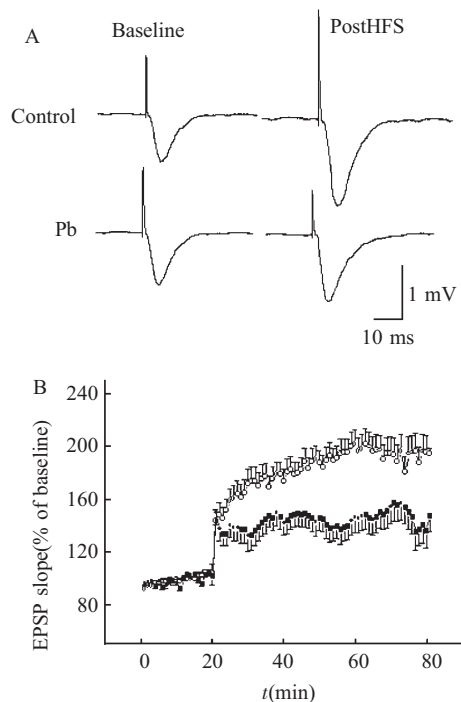
组织中的铅的含量明显增加 (*P*<0.05)。但铅暴露组和锂加铅处理组的海马组织铅的浓度没有显著性的差异 (*P*>0.05)。

**2.2 慢性铅暴露抑制海马脑片 CA1 区长时程增强效应 (LTP)**

记录大鼠海马 CA3-CA1 通路 Schaffer 侧支, LTP 的幅度用高频刺激 (100 Hz, 1 s) 后能得到的 EPSP 波形的起始斜率与刺激前用条件刺激得到的 EPSP 波形的起始斜率之比来表示。图 1 示出了对照组和铅处理组大鼠海马 CA1 区用高频刺激诱导的 LTP。结果显示, 强直后 60 min 内, 对照组用高频刺激能诱导出稳定的 LTP(194.42± 14.05%, *n*=10)。用同样的高频刺激铅暴露组大鼠海马 CA1 区诱导出 LTP 的幅度明显降低 (147.06± 9.55%, *n*=13, *P*<0.01), 与对照组相比较铅处理组 LTP 的幅度降低了 47.36%。

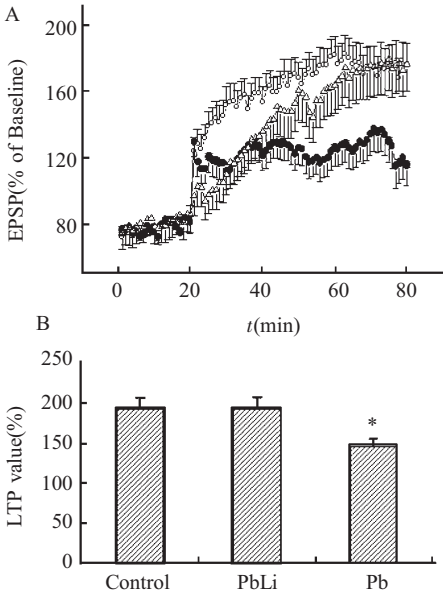
**2.3 锂对铅引起的大鼠海马 CA1 区 LTP 损伤的修复作用**

图 2 示出了对照组, 铅处理组和铅加锂处理组



**Fig.1** Effect of lead exposure on the LTP of extracellular recorded field EPSPs in CA1 region in rat hippocampus. (A) is the traces of extracellular recorded field potentials in control and lead-exposed conditions. (B) shows LTP in control group and in lead-exposed group. The arrow shows the application of high frequency stimulation. -○ - Control -● -Pb

大鼠海马 CA1 区用高频刺激诱导的 LTP (图 2A) 和这三组 LTP 的统计直方图 2B。结果显示: 用 100 Hz 的高频刺激能诱导锂加铅处理组大鼠海马 CA1 区稳定的 LTP, 锂能明显提高铅处理组大鼠海马 CA1 区 LTP 的幅度 (铅处理组为  $147.06 \pm 9.55\%$ ,  $n=13$ ; 铅加锂处理组为  $193.45 \pm 14.91\%$ ,  $n=15$ , 图 2A)。图 2B 显示: 锂加铅处理组大鼠海马 CA1 区 LTP 与对照组相比较, 没有明显的差异 ( $P>0.05$ ); 而与铅处理组相比, 则有显著性差异 ( $P<0.01$ )。从图 2A 中看出, 锂影响了 LTP 的早期诱导过程。

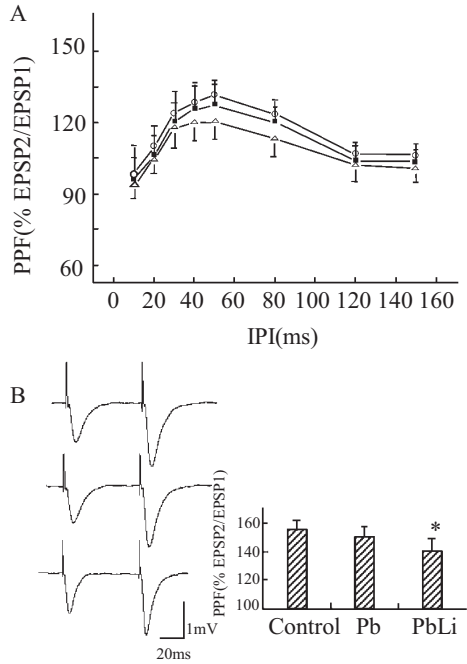


**Fig.2** Effect of lithium administration on LTP of extracellular recorded field EPSPs in CA1 region of lead-exposed rat hippocampus. (A) shows the LTP in control, lead-exposed and lead plus lithium administration groups. -○ - Control -● - Pb -△-Pb+Li. (B) is the histograms of the LTP values in three groups, The asterisk denotes statistic significance ( $P<0.05$ ). The arrow shows the application of high frequency stimulation

**2.4 锂抑制大鼠海马 CA1 区的双脉冲易化 (PPF)**

图 3A 分别示出对照组, 铅处理组和锂加铅处理组的海马 CA1 区的双脉冲反应曲线。脉冲间隔 (Inter-pulse Interval, IPI) 范围为 10–150 ms。纵坐标为第二个反应与第一个反应的比值 (EPSP2/EPSP1), 横坐标为脉冲间隔。铅暴露和锂加铅处理对大鼠海马 CA1 区脉冲间隔为 10–150 ms 的 PPF 有不同程度的抑制。在脉冲间隔为 50 ms 时, PPF 的数值达到最大。图 3B 的左

图示出脉冲间隔为 50 ms 时各组 PPF 的单个波形。对照组 PPF 的幅值为  $155.58 \pm 6.35\%$  ( $n=7$ ); 铅暴露组为  $150.26 \pm 13.74\%$  ( $n=8$ ); 锂加铅处理组:  $140.59 \pm 15.42\%$  ( $n=8$ )。慢性铅暴露不影响脉冲间隔为 50 ms 的 PPF ( $P>0.05$ ), 而锂明显抑制脉冲间隔为 50 ms 的 PPF ( $P<0.05$ )。



**Fig.3** Effect of lead and lithium on PPF in CA1 region of rat hippocampus. Paired-pulse facilitation is affected by lithium. (A) shows the PPF measured at different interstimulus intervals in control, lead-exposed and lead plus lithium administration groups. -○ - Control -● - Pb -△-Pb+Li. (B) is the sample traces of paired-pulse facilitation and the histograms of the values of PPF measured at 50ms inter-pulse interval in three groups. The asterisk denotes statistic significance ( $P<0.05$ )

**3 讨 论**

LTP 作为突触可塑性变化的重要形式, 被认为是学习记忆的一种可能机制和度量指标<sup>[7]</sup>, 慢性锂处理能显著提高铅暴露组的 LTP 的幅度, 表明慢性锂治疗可能缓解铅造成的某些神经功能的损伤, 为研究驱铅药物提供了依据。由于锂处理后明显抑制了大鼠海马 CA1 区脉冲间隔为 50 ms 的 PPF, 锂可能通过突触前的机制, 比如提高递质的释放量, 来实现自己的功能。研究还显示锂处理没有影响大鼠海马组织中铅的浓度, 表明锂并没有影响大鼠海马对铅的吸收和代谢。胆碱能神经传递在学习

记忆中起重要的作用, 铅暴露能抑制胆碱能神经元突触传递<sup>[11]</sup>, 而锂能提高胆碱能神经元突触传递, 因此锂有可能通过提高胆碱能神经元突触传递来减少铅对神经系统的毒性。慢性锂处理可以增加小鼠海马区的神经再生, 这种再生的神经元相对于一般的神经元在突触可塑性中起着更重要的作用<sup>[12]</sup>, 因此, 锂也可能通过增加神经元再生来提高海马的突触可塑性<sup>[12]</sup>。Bcl-2 是一种有保护神经元和阻止神经元凋亡作用的蛋白, 研究发现, 慢性锂处理能提高高组织的 Bcl-2 的含量<sup>[13]</sup>, 这与锂的神经保护和神经营养作用相一致<sup>[9]</sup>, 这些效应是否都与降低铅的神经毒性有关尚待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Bellinger D, Sloman J, Leviton A, et al. Low-level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years[J]. *Pediatrics*, 1991,87:219-227.
- [2] Davis JM, Svendsgaard DJ. Lead and child development[J]. *Nature*, 1987,329:297-300.
- [3] Needleman HJ, Gatsonis CA. Low-level lead exposure and the IQ of children[J]. *JAMA*, 1990,263:673-678.
- [4] Bellinger D, Leviton A, Wateraux C, et al. Low-level lead exposure, social class, and infant development[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1989,10:497-503.
- [5] Davis JM, Otto DA, Weil DE, et al. The comparative development neurotoxicity of lead in humans and animals [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1990,12:215-229.
- [6] Rosen JF. Health effects of lead at low exposure levels[J]. *Am J Dis Child*, 1992,28:454-458.
- [7] Lasley SM, Gilbert ME. Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neurotoxicology*, 2000,21(6):1057-1067.
- [8] Cai L, Ruan DY, Xu YZ, et al. Effects of lead exposure on long-term potentiation induced by 2-deoxy-D-glucose in area CA1 of rat hippocampus in vitro[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2001,23:1-7.
- [9] Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium at 50: Have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked [J]? *Biol Psychiatry*, 1999,46:929-940.
- [10] Sui L, Ruan DY, Ge SY, et al. Two Components of long-term depression are impaired by chronic lead exposure in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus in vitro[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000,22:741-749.
- [11] Costa LG, Fox DA. A selective decrease of cholinergic muscarinic receptors in the visual cortex of adult rats following development lead exposure[J]. *Brain Res*, 1983,276:259-266.
- [12] Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N and Manji HK, Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2000,75(4):1729-1734.
- [13] Chen RW, Chuang DM., Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases bcl-2 expression[J]. *J Biol Chem*, 1999,274:6039-6042.

## LITHIUM RESTORES THE LEAD-INDUCED IMPAIRMENT OF THE LONG-TERM POTENTIATION IN THE CA1 REGION OF RAT HIPPOCAMPUS

ZHONG Gui-sheng, YAO Ying, RUAN Di-yun

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei Anhui 230027, China)

**Abstract:** The protective effects of lithium on the lead-induced impairment of long-term potentiation (LTP) were studied by recording excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in CA1 region of rat hippocampus in vitro. The LTP amplitude in hippocampus slices of control rats, chronic lead exposure rats and chronic lithium plus lead administration rats are  $194.42 \pm 14.05\%$  ( $n=10$ );  $147.06 \pm 9.55\%$  ( $n=13$ ) and  $193.45 \pm 14.91\%$  ( $n=15$ ) respectively. Chronic lead exposure inhibited LTP amplitude while chronic lithium administration almost restores the impairment of LTP by lead exposure. Chronic lead and lithium exposure differently inhibited paired-pulse facilitation (PPF) and the inhibitory effect was largest when PPF was measured at 50ms inter-pulse interval. The PPF value in control:  $155.58 \pm 6.35\%$  ( $n=7$ ); Pb:  $150.26 \pm 13.74\%$  ( $n=8$ ); PbLi:  $140.59 \pm 15.42\%$  ( $n=8$ ). The results showed that chronic lithium administration may protect the impairment of LTP caused by chronic lead exposure in CA1 region of rat hippocampus.

**Key Words:** Lithium; Lead; Hippocampal slices; Long-term potentiation