

(4): 304-305.

- [5] 王守英, 席景砖, 李福成, 等. 血清化学元素与地方性氟中毒的关系 [J]. 新乡医学院学报, 2005, 22 (3): 198-199.
- [6] 万桂敏, 莫志亚, 刘忠杰, 等. 地方性氟中毒患者多项检验指标的测定及分析 [J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20 (2):

137-139.

- [7] 陈应康, 田培燕, 叶劲松, 等. 燃煤性氟骨症患者血清钙、磷及碱性磷酸酶的变化 [J]. 河北北方学院学报, 2008, 25 (4): 27-28.

镧对子代大鼠学习记忆能力、海马神经细胞钙稳态及 ERK 蛋白表达的影响

Effects of lanthanum on learning and memory abilities, calcium homeostasis and ERK expression in hippocampus neurons of offspring rats

庞妍^{1,2}, 杨敬华¹, 刘秋芳¹, 靳翠红¹, 巫生文¹, 刘慧颖¹, 蔡原¹

PANG Yan^{1,2}, YANG Jing-hua¹, LIU Qiu-fang¹, JIN Cui-hong¹, WU Sheng-wen¹, LIU Hui-ying¹, CAI Yuan¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院卫生毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市第九人民医院理化实验室, 辽宁 沈阳 110024)

摘要: 雌性 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 对照组饮用蒸馏水, 3 个染毒组分别饮用不同浓度的氯化镧 (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L) 水溶液, 从雌鼠受孕起至子鼠断乳后 1 个月连续染镧。采用 Morris 水迷宫检测子代大鼠学习记忆能力, Fura-2/AM 探针法检测海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, Western blot 法检测海马组织 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平。结果表明, 随氯化镧染毒剂量的增加, 子代大鼠寻找平台的潜伏期和游泳距离增加 ($P < 0.05$), 在目标象限的停留时间减少 ($P < 0.05$), 神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高 ($P < 0.05$), p-ERK1/2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。提示氯化镧染毒可以造成子代大鼠学习记忆能力下降, 其原因可能与其导致神经细胞内钙稳态失衡及 p-ERK1/2 蛋白表达水平下降有关。

关键词: 镧; 学习记忆; 水迷宫; 钙离子; ERK

中图分类号: R135.1; O614.331 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)05-0365-03

近年来, 稀土元素对中枢神经系统和学习记忆的有害影响已引起人们关注^[1]。镧是稀土元素中轻稀土元素的代表, 化学性质活泼且较易在脑中蓄积, 其对学习记忆的影响已有报道, 但机制尚未完全明确^[2]。本研究通过 Morris 水迷宫试验观察镧对子代大鼠学习记忆的影响, 并从海马神经细胞内钙稳态及细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 蛋白表达水平的角度来探讨镧损害学习记忆的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与染毒方法

60 只清洁级雌性 Wistar 大鼠, 由中国医科大学实验动物

中心提供, 动物证号: SYXK (辽) 2008-0005, 体重 (240 ± 10) g。随机将雌鼠分为对照组, 饮用蒸馏水; 低、中、高剂量染镧组, 饮用浓度分别为 2.5、5、10 g/L LaCl_3 的蒸馏水溶液; 每组 15 只动物。然后将雌雄大鼠按 1:1 合笼, 次日晨发现阴栓者定为受孕, 记为妊娠第 0 d, 以自由饮水方式对各实验组动物进行染镧。子代大鼠在断乳之前经由母体血循环和吮吸母乳染镧, 断乳后则通过自由饮水摄入镧, 至断乳后 1 个月结束。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 Morris 水迷宫 定位航行试验训练每天 1 次, 连续 5 d, 1 周后进行检测。检测内容包括定位航行试验和空间探索试验两部分。定位航行试验中, 将子鼠面向池壁放入水中, 检测其寻找平台的逃避潜伏期及游泳距离。定位航行试验结束后, 间隔 10 min 后撤除站台, 进行空间探索试验。观察并记录 60 s 内动物在原站台所在象限的停留时间。将各组动物数据做统计学比较, 判断镧对动物空间学习记忆能力的影响。

1.2.2 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度测定 子鼠麻醉处死后立即断头取脑, 在冰浴上快速切取海马组织, 加入 0.25% 胰酶 37 °C 消化, 改良杜氏伊格培养基 (dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) [含 10% (V/V) 的小牛血清] 终止消化, 过 200 目筛网, 滤液离心后, 弃上清, 以 D-Hanks 液重悬细胞。经台盼蓝排斥实验检测, 细胞存活率达 95% 以上, 调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml。加入 Fura-2/AM, 37 °C 水浴后冷冻离心, 弃上清, 用 D-Hanks 液定容。采用荧光双波长分光光度计测定 Ca^{2+} 荧光强度。测定条件: 激发光光栅 5 nm, 发射光光栅 10 nm, 测定温度维持在 (37 ± 1) °C, 避光。取细胞悬液, 以激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射波长 510 nm 进行扫描。加入破膜剂 10% Triton X-100, 测定最大荧光比值 (R_{max}), 待曲线平稳后加入 0.3% EDTA, 测定最小荧光比值 (R_{min})。由系统定量软件自动求出 Ca^{2+} 浓度。

1.2.3 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白含量测定 子鼠麻醉处死

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072316); 辽宁省教育厅科研项目计划 (No. L2010702)

作者简介: 庞妍 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 金属毒理与神经毒理。

通讯作者: 蔡原, E-mail: cmuycai@163.com。

后立即断头取脑,分离出海马组织, -70°C 深冻冰箱备用。取海马组织样品,加入预冷的裂解液超声粉碎制成匀浆,提取总蛋白。采用 Bradford 法测定蛋白含量。把样品调成相同浓度并加热变性,取总量相同的蛋白,在 10% SDS-聚丙烯酰胺中电泳分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜上,分别用 5% 脱脂奶粉和 BSA 封闭 PVDF 膜 2 h, PBST 洗膜后,分别加入兔抗大鼠 ERK1/2 一抗 (1:1 000)、兔抗大鼠 p-ERK1/2 一抗 (1:1 000)、兔抗大鼠 β -actin 一抗 (1:500) 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次,再加入羊抗兔 IgG 二抗孵育 2 h, PBST 再次洗膜 3 次后, ECL 显影。采用 Sion Image 软件分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。

1.3 数据分析

采用 SPSS17.0 进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用单因素方差分析方法 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验,当组间差异具有统计学意义时,采用 LSD 法进行两组间差异的显著性检验, $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 镧对子代大鼠空间学习记忆的影响

2.1.1 定位航行试验 由表 1 可见,低剂量组大鼠寻找平台潜伏期和游泳距离显著高于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组大鼠寻找平台潜伏期和游泳距离显著高于对照组和低剂量组 ($P < 0.05$),高剂量组大鼠寻找平台潜伏期和游泳距离显著高于对照组和低、中剂量组 ($P < 0.05$)。

表 1 不同剂量 LaCl_3 组子鼠定位航行试验中逃避潜伏期和游泳距离

组别	<i>n</i>	寻找平台潜伏期 (s)	游泳距离 (cm)
对照组	8	12.42 $\pm$ 4.86	213.24 $\pm$ 84.29
低剂量组	8	25.33 $\pm$ 9.97*	326.20 $\pm$ 144.01*
中剂量组	8	45.03 $\pm$ 17.48*#	705.79 $\pm$ 282.10*#
高剂量组	8	58.53 $\pm$ 4.55*# Δ	939.61 $\pm$ 168.86*# Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$; 与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.1.2 空间探索试验 由表 2 可见,低剂量组大鼠目标象限停留时间显著少于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组大鼠目标象限停留时间显著少于对照组和低剂量组 ($P < 0.05$),高剂量组大鼠目标象限停留时间显著少于对照组和低、中剂量组 ($P < 0.05$)。

表 2 不同剂量 LaCl_3 组子鼠空间探索试验中目标象限停留时间

组别	<i>n</i>	目标象限停留时间 (s)
对照组	8	25.275 $\pm$ 5.183
低剂量组	8	19.188 $\pm$ 1.374*
中剂量组	8	14.025 $\pm$ 0.826*#
高剂量组	8	6.463 $\pm$ 3.167*# Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$; 与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 镧对子代大鼠海马组织细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

由表 3 可见,低剂量组大鼠海马细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组大鼠海马细胞内 Ca^{2+} 浓度显

著高于对照组和低剂量组 ($P < 0.05$),高剂量组大鼠海马细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组和低、中剂量组 ($P < 0.05$)。

表 3 不同剂量 LaCl_3 组子代大鼠海马细胞内 Ca^{2+} 浓度

组别	<i>n</i>	Ca^{2+} 浓度 (nmol/L)
对照组	8	186.51 $\pm$ 9.26
低剂量组	8	263.02 $\pm$ 20.44* ¹
中剂量组	8	388.60 $\pm$ 23.21*#
高剂量组	8	597.39 $\pm$ 22.58*# Δ

注:与对照组比, * $P < 0.05$; 与低剂量组比, # $P < 0.05$; 与中剂量组比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 镧对大鼠海马 ERK1/2 蛋白的影响

由图 1 可见,低、中、高剂量组大鼠海马 ERK 蛋白表达水平与对照组相近,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且各染镧剂量组间亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 镧对子代大鼠海马 p-ERK1/2 蛋白的影响

由图 2 可见,低剂量组大鼠海马 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组大鼠海马 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著低于对照组和低剂量组 ($P < 0.05$),高剂量组大鼠海马 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著低于对照组和低、中剂量组 ($P < 0.05$)。

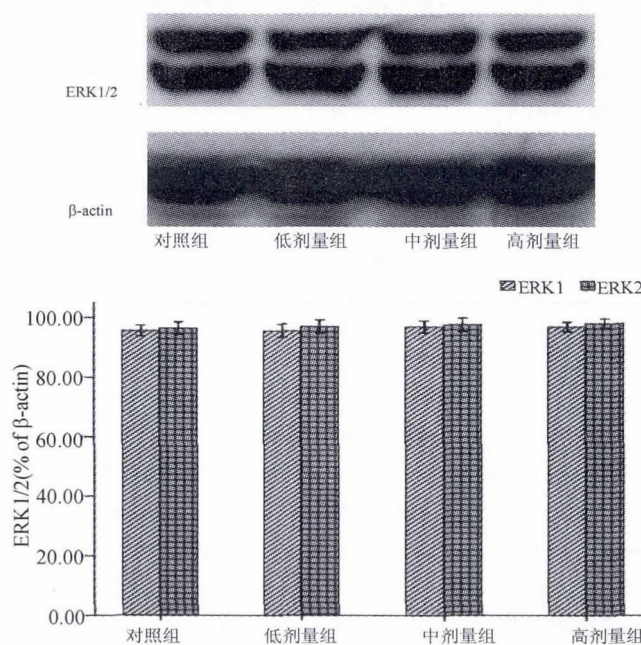
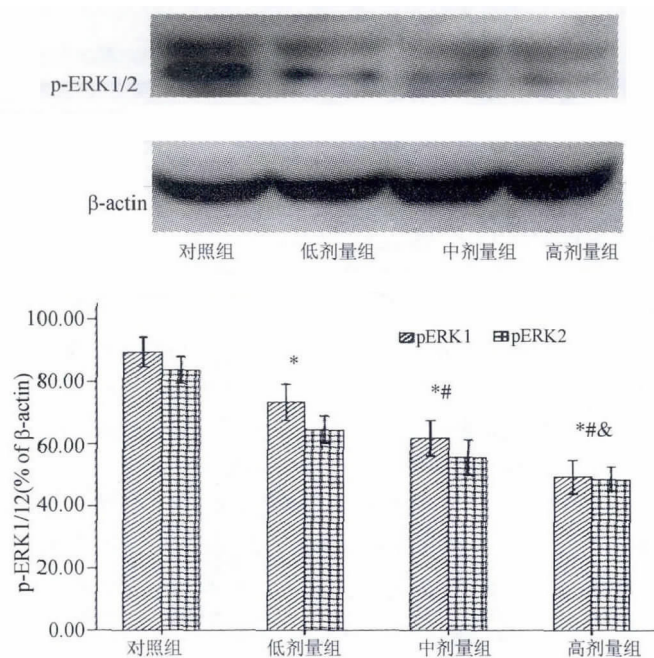


图 1 不同剂量 LaCl_3 组子代大鼠海马 ERK1/2 蛋白的表达水平

3 讨论

稀土元素能够透过血脑屏障进入大脑并在其中蓄积,损伤实验动物的神经行为和学习记忆能力。Che 等人^[3]的研究表明, LaCl_3 经脑室注射染毒,当剂量为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时可损伤鸡的空间认知能力,并且呈现出剂量-反应关系。He^[4]等人的研究表明,大鼠在经口染毒剂量达 40 mg/kg LaCl_3 时,可以使受试动物的神经行为和学习记忆能力明显受损。本研究显示,低、中、高剂量 LaCl_3 染毒组大鼠在定位航



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与低剂量组比较，# $P < 0.05$ ；与中剂量组比，△ $P < 0.05$ 。

图2 不同剂量 LaCl_3 组子代大鼠海马 p-ERK1/2 蛋白的表达水平

行试验和空间探索试验的行为表现均比对照组显著下降，并随染毒剂量的增加而加重。说明在本实验条件下， LaCl_3 确能损伤受试动物的空间学习记忆能力。

Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使，是中枢神经系统多个信号转导通路的启动因子。有研究证实，当神经细胞内 Ca^{2+} 的调控机制发生紊乱时，可导致 Ca^{2+} 超载，引发兴奋性毒性，损害神经细胞的功能并造成学习记忆功能的缺陷^[5]。在本研究中，随着染镧剂量的升高，海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高，低、中、高剂量 LaCl_3 染毒组分别达到对照组的

1.41 倍、2.08 倍和 3.2 倍，提示镧可造成细胞内钙稳态失衡，并由此导致其下游的信号转导异常，影响学习记忆。

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的亚族之一，属于丝/苏氨酸蛋白激酶，可被细胞外的多种信号所激活，其中 Ca^{2+} 内流对 ERK1/2 激活发挥着重要的作用。ERK 激活与神经突触可塑性及长时程增强 (long term potentiation, LTP) 的形成关系密切^[6]。本研究检测了 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的蛋白表达水平，发现各 LaCl_3 染毒组 ERK1/2 表达与对照组相近，但 p-ERK1/2 的表达水平较对照组显著下降，低、中、高剂量 LaCl_3 染毒组 p-ERK1 分别下降至对照组的 67.0%、58.9% 和 46.6%；p-ERK2 分别下降至对照组的 66.8%、59.7% 和 53.1%。说明镧并不干扰 ERK1/2 的表达，但可影响 ERK1/2 的磷酸化，抑制其活性，进而损伤大鼠的学习记忆能力。

参考文献：

(上接第 360 页)

- [11] Parks C G, Conrad K, Cooper G S. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease [J]. *Environ Health Perspect*, 1999, 107 (Supple 5): 793-802.
- [12] Andersson I, Bornberger S, Persson B, et al. The dental technician project 1982—1993 [J]. *Tandteknikern*, 1984, 53 (3): 92-132.
- [13] Selden A I, Persson B, Bornberger-Dankvardt S I, et al. Exposure to cobalt chromium dust and lung disorders in dental technicians [J]. *Thorax*, 1995, 50 (7): 769-772.
- [14] Radi S, Dalphin J C, Manzoni P, et al. Respiratory morbidity in a population of french dental technicians [J]. *Occup Environ Med*, 2002, 59 (6): 398-404.
- [15] Sherson D, Maltbaek N, Ollsen O. Small opacities among dental laboratory technicians in copenhagen [J]. *Br J Ind Med*, 1988, 45 (5): 320-324.

- [1] 杨敬华, 蔡原, 刘秋芳, 等. 镧对大鼠学习记忆及大脑皮质 c-fos mRNA 和 c-Fos 蛋白表达的影响 [J]. *卫生研究*, 2009, 38 (3): 348-351.
- [2] Yang J H, Liu Q F, Zhang L F, et al. Lanthanum chloride impairs memory, decreases pCaMK IV, pMAPK and pCREB expression of hippocampus in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190: 208-214.
- [3] Che Y, Xing R, Zhu Y F, et al. Effects of lanthanum chloride administration on detouring learning in chicks [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143: 274-280.
- [4] He X, Zhang Z Y, Zhang H F, et al. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 103 (2): 354-361.
- [5] 杨敬华, 蔡原, 刘秋芳, 等. 镧对大鼠大脑皮质兴奋性氨基酸和钙稳态的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26 (8): 675-677.
- [6] Peng S, Zhang Y, Zhang J N, et al. ERK in learning and memory: A review of recent research [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11: 222-232.
- [16] Choudat D, Triem S, Weill B, et al. Respiratory symptoms, lung function, and pneumoconiosis among self employed dental technicians [J]. *Br J Ind Med*, 1993, 50 (5): 443-449.
- [17] Froudarakis M E, Voloudaki A, Bouros D, et al. Pneumoconiosis among Cretan dental technicians [J]. *Respiration*, 1999, 66 (4): 338-342.
- [18] Kadoya C, Ogami A, Morimoto Y, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid adhering to lung surfactant [J]. *Ind Health*, 2012, 50 (1): 31-36.
- [19] Schle C, Muhlfeld C, Pulskamp K, et al. The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure [J]. *Respir Res*, 2009, 10 (1): 90.
- [20] Christma J W, Emerson R J, Hemenway D R, et al. Effects of work exposure retirement, and smoking on bronchoalveolar lavage measurements of lung dust in vermont granite works [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144 (6): 1307-1313.