

饮水砷暴露对子代雌性大鼠海马组织神经生长因子、神经生长相关蛋白 mRNA 表达的影响

范梅卿, 张志劬, 詹平[△]

重庆医科大学公共卫生学院 劳动与环境卫生教研室 (重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨孕期和哺乳期大鼠亚砷酸钠暴露后,对第一子代雌性大鼠海马神经生长因子(NGF)和神经生长相关蛋白-43(GAP-43)mRNA 表达的影响。方法 12 只雌鼠于受孕后第 6 d 开始以自由饮水方式分别暴露于 0、10、50、100 mg/L NaAsO₂ 水溶液,连续染毒直到仔鼠出生后第 21 d,取子代雌性大鼠海马组织进行 HE、尼氏体染色观察海马 CA1、CA3、DG 区神经元的形态及数目改变;应用 RT-PCR 检测各组仔鼠海马 NGF、GAP-43 mRNA 的表达。结果 HE 结果显示对照组仔鼠 CA1、CA3 区海马神经元细胞结构正常,各染毒组仔鼠可见海马神经元边缘欠清晰,胞体皱缩,有核固缩等凋亡征象。尼氏体染色,对照组海马神经元胞浆富含尼氏体,随着染毒剂量的增加,尼氏体减少,其中以 CA1 区损伤最为明显。RT-PCR 结果显示,各剂量组仔鼠 NGF、GAP-43 mRNA 表达降低,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。各毒暴露组之间 NGF、GAP-43 mRNA 的表达随砷剂量增高而下降(P 均 < 0.05)。结论 大鼠孕期和哺乳期砷暴露,可以损伤第一子代雌性大鼠海马神经元细胞,抑制海马区 NGF、GAP-43 mRNA 的表达,从而损害学习记忆能力。

【关键词】 砷 第一子代 神经生长因子 神经生长相关蛋白-43

Effects of Arsenic on Nerve Growth Factor and Nerve Growth Related mRNA Expression in F1 Hippocampal FAN Mei-qing, ZHANG Zhi-qu, ZHAN Ping[△]. Department of Environment Hygiene, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[△] Corresponding author, E-mail: zanpingcqums@163.com

【Abstract】 Objective To observe the mRNA expression of nerve growth factor (NGF) and nerve growth related proteins-43 (GAP-43) on hippocampus of F1 generation female rats after the pregnancy and lactation rats exposure to arsenic sodium. **Methods** 12 of pregnancy rats were exposed to arsenic (0, 10, 50, 100 mg/L, respectively in drinking water) from the 6 gestation day till F1 pups being 21 days old. Select females for experiments. Observe the change of form and numbers in CA1, CA3, DG area neurons in hippocampus by HE and Nissl's stain. By means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), NGF and GAP-43 mRNA in hippocampus tissues in rats was measured. **Results** HE stain showed that, in CA1 and CA3 area, the structure of hippocampus neurons was normal in control group. In experiment groups, the apoptosis phenomena were found in hippocampus neurons including edge unclear, cell shrinkage and nuclear condensation, especially in high dose group. The hippocampus neuronal cytoplasm was rich in Nissl bodies in control group with Nissl's stain. With the experiment dose increasing, Nissl bodies were decreased especially in CA1 area. RT-PCR results demonstrated that the expression of NGF and GAP-43 mRNA were reduced significantly in experiment groups when compared with that of control (both $P < 0.01$). The expression of NGF and GAP-43 mRNA were decreased as the dose of arsenic increasing (both $P < 0.05$). **Conclusion** Rats exposure to arsenic during pregnancy and lactation, can damage hippocampus neuronal cell, and restrain the NGF and GAP-43 mRNA expression of F1 generation female rat, damaged the learning and memory ability at last.

【Key words】 Arsenic The F1 NGF GAP-43

砷是一种在自然界中分布广泛的类金属。自 20 世纪 80 年代孟加拉、印度、中国大陆和台湾等因饮用高砷水爆发大面积砷中毒以来,慢性砷中毒已经成为一个全球性公共卫生问题^[1]。研究表明砷暴

露对青少年中枢神经系统的损害突出表现为对学习记忆能力的损害,暴露于饮水砷和智力下降呈剂量反应关系^[2],儿童的 IQ 随着尿砷的升高而显著下降,儿童智商与其尿砷水平呈负相关^[3-5]。砷可引起子代大鼠学习记忆能力、行为能力降低^[6]。这些流行病学调查结果与动物实验结果相一致,但砷影

响儿童学习记忆的的机制尚不清楚。

海马是学习记忆的结构基础。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和神经生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43, 又称 B₅₀ 神经调素)是神经生长发育的两个相关基因。目前国内外关于砷对 NGF、GAP-43 影响的研究报道不多,本课题从研究砷对子代雌性大鼠海马组织形态学改变、海马组织 NGF、GAP-43 基因表达的影响入手,为进一步探讨砷对神经系统发育和学习记忆能力损害提供实验室依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

雄性 SD 大鼠,体质量 300~350 g,6 只,雌性 SD 大鼠,体质量 230~260 g,12 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

亚砷酸钠(NaAsO₂ 分析纯,上海化学试剂总厂),Trizol(美国 ROCHE 公司),Taq 酶、DNaseI(RNase free,大连宝生物 TaKaRa 公司),M-Mulv Reverse Transcriptase (Promega 公司),DNA Marker(大连宝生物 TaKaRa 公司)。ABI2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司),Bio-Rad PowerPac Basic 电泳仪、全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物染毒及分组 雌雄 SD 大鼠分笼饲养,观察一周后,每日晚 8 点按雌性/雄性 2:1 合笼交配,次日清晨对雌性大鼠阴道涂片检查精子,查到精子定为妊娠第 0 d。

将 12 只孕鼠随机分为 4 组,其中 3 组从妊娠的第 6 d 开始染毒,将 NaAsO₂ 溶于蒸馏水中,孕鼠自由饮用,饮水中的砷染毒剂量分别为 10、50、100 mg/L,直至仔鼠生后第 21 d,另一组为对照组,孕鼠自由饮用蒸馏水。

实验结束后处死各组仔鼠(每组每只孕鼠产仔鼠 10~12 只,雌鼠 4~5 只),鉴于雌激素对神经发育的保护作用,能防止细胞衰亡,维持神经元的功能和形态,雌鼠更能反映实验结果,因此我们选取了子代雌性大鼠,并取其大脑,分离出海马组织,于液氮中保存。

1.2.2 HE 染色和尼氏体染色 每组随机取 5 只仔鼠的脑组织经 40 g/L 多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,隔 5 取 1,组成 1 套,分别用于 HE 染色和尼氏体染色。400 倍镜下观察仔鼠海马组织 HE 染色结果。200 倍镜下观察仔鼠海马组织尼氏

体染色结果。

1.2.3 NGF 和 GAP-43 mRNA 表达的检测 内参 β -actin 引物序列为:上游 5'-CCTGAAGTACCC CATTGAACAC-3',下游 5'-CTCATTGCCGATA GTGATGACC-3',产物长度为 562 bp。NGF 引物序列为:上游 5'-CTTCAGCATTCCTTGACACA G-3',下游 5'-CTTATCTCCAACCCACACACTG-3',产物长度为 342 bp。GAP-43 引物序列为:上游 5'-GCTGAGACAGAAAGTGCTGCTA-3',下游 5'-GGGTCTTCTTTACCCTCATCCT-3',产物长度为 293 bp。在 NCBI 官方网站上查找出各基因的 mRNA 序列,用 Primer5 软件设计引物,引物由大连宝生物 TaKaRa 公司合成。在每组中随机选择 9 只仔鼠的海马进行 RT-PCR。按试剂盒说明书步骤提取总 RNA,按常规方法制备 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像分析系统进行光密度扫描。以目的条带光密度值/ β -actin 条带光密度比值为相对表达量。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仔鼠海马组织 HE 染色

对照组仔鼠海马神经元细胞丰富完整,边缘清晰,细胞核呈圆形、椭圆形,染色质在核内分布较均匀,核仁清晰(图 1)。各砷染毒组仔鼠可见海马神经元边缘欠清晰,胞体皱缩,核固缩,以 100 mg/L NaAsO₂ 组最为严重,而损伤以 CA1、CA3 区最为严重(图 2)。

2.2 仔鼠海马组织尼氏体染色

对照组仔鼠海马神经元胞浆富含尼氏体,形态正常,细胞核呈浅蓝色,大而圆,核仁明显,随着染毒剂量的增加,尼氏体减少,细胞核出现核固缩。100 mg/L NaAsO₂ 组减少最明显,50 mg/L NaAsO₂ 组次之,10 mg/L NaAsO₂ 组最轻。损伤以 CA1 区最为严重(图 3)。

2.3 海马组织 NGF、GAP-43 mRNA 的表达

RT-PCR 结果见图 4,结果显示,砷染毒组仔鼠海马组织 NGF、GAP-43 mRNA 的表达较对照组仔鼠降低(P 均 < 0.001)。各砷染毒组之间仔鼠海马组织 NGF、GAP-43 mRNA 的表达随砷剂量增高而下降(P 均 < 0.05),见附表。

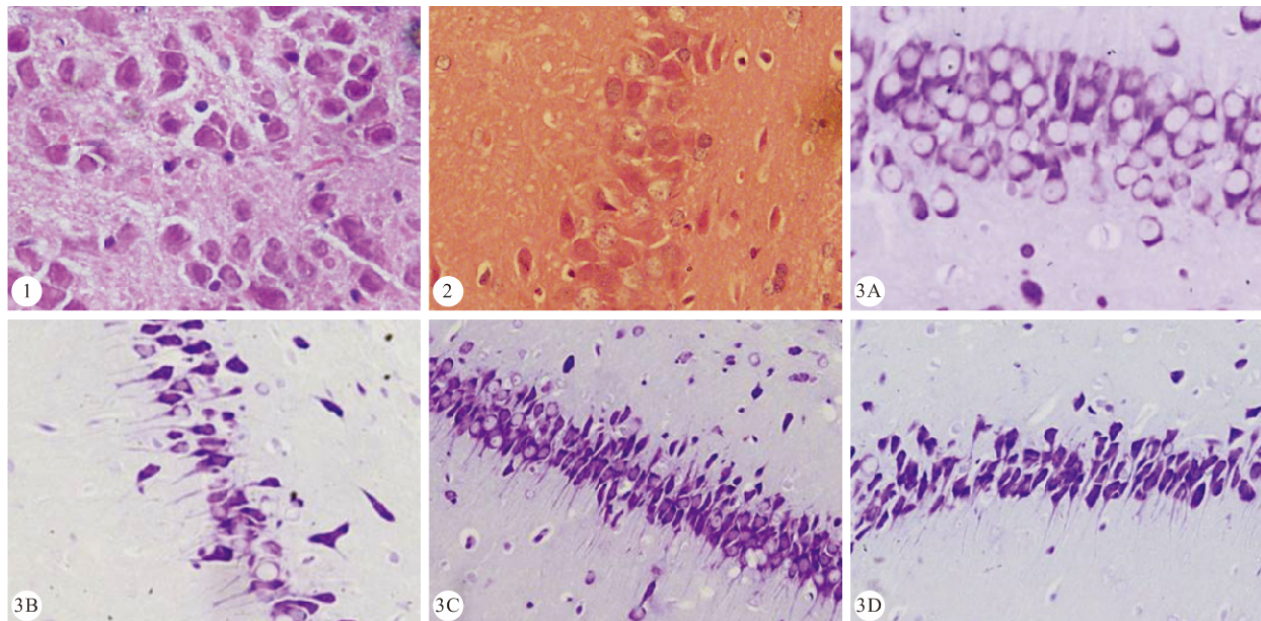


图 1 对照组 CA1 区 HE 染色。×400 图 2 100 mg/L NaAsO₂ 组 CA1 区 HE 染色。×400 图 3 仔鼠对照组(A)和各种染毒组 (B, 10 mg/L NaAsO₂; C, 50 mg/L NaAsO₂; D, 100 mg/L NaAsO₂) CA1 区尼氏体染色结果。×200

Fig 1 HE stain of CA1 area in control group. ×400 Fig 2 HE stain of CA1 area in 100 mg/L NaAsO₂ group. ×400 Fig 3 Nissl's stain of CA1 area in control (A), NaAsO₂ 10 mg/L (B), 50 mg/L (C) and 100 mg/L (D) groups. ×200

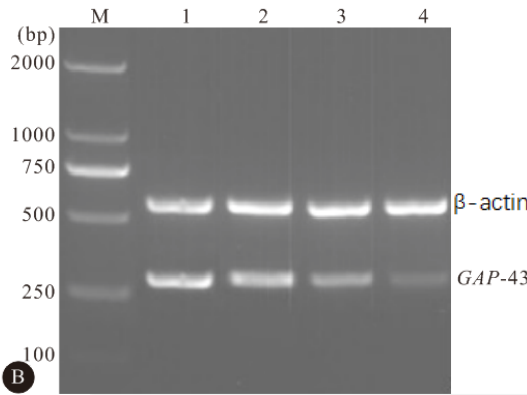
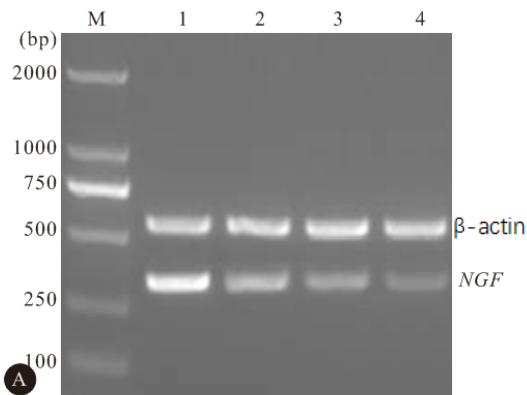


图 4 NaAsO₂ 染毒对海马组织 NGF mRNA (A) 和 GAP-43 mRNA (B) 表达的影响

Fig 4 The mRNA expression of NGF (A) and GAP-43 (B) mRNA in hippocampus exposed to NaAsO₂

M: Marker; 1: Control group; 2,3,4: NaAsO₂10 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg groups

附表 NaAsO₂ 对仔鼠海马组织 NGF、GAP-43 mRNA 表达的影响 (x̄ ± s)

Table The expression of NGF and GAP-43 mRNA in hippocampus exposed to NaAsO₂ (x̄ ± s)

Group	n	NGF mRNA	GAP-43 mRNA
Control	9	1.080 ± 0.128	0.859 ± 0.107
NaAsO ₂ 10 mg/L	9	0.626 ± 0.038 *	0.748 ± 0.118 *
NaAsO ₂ 50 mg/L	9	0.366 ± 0.072 * ·△	0.492 ± 0.083 * ·△
NaAsO ₂ 100 mg/L	9	0.205 ± 0.096 * ·△	0.218 ± 0.046 * ·△

* P < 0.001, vs. control group; △ P < 0.05, vs. the neighboring concentration group

3 讨论

海马在冠状位上分为 CA1、CA2、CA3、CA4 区,其中,CA1 区是脑内参与记忆贮存功能的重要部位,其锥体细胞轴突投射到前脑的广泛区域,参与构成一些重要环路,被认为是海马传出的门户^[7]; CA3 区被认为与空间辨别性学习记忆活动的关系尤为密切。海马是学习记忆的结构基础,主要参与记忆的保持以及长时程记忆等的管理和调控活动^[8],海马神经细胞结构、功能和代谢活动损伤,将会造成学习记忆以及行为能力等脑的高级功能活动能力降低^[9]。尼氏体存在于神经元胞体内,具有合成蛋白质包括复制细胞器所需的蛋白质和产生递质有关的酶,与神经元的功能极为密切,可作为一种观察神经元损伤很灵敏的指标。本研究参考席淑华等^[6]中的砷染毒剂量进行研究母源性砷暴露对子代

大鼠海马中的 NGF、GAP-43 mRNA 表达的影响。砷是一种神经毒物,从 HE 染色和尼氏体染色结构中发现母源性暴露于砷的仔鼠,海马部分神经细胞神经元边缘欠清晰,胞体皱缩,有核固缩等凋亡征象,中高剂量组有加重趋势,并且以 CA1、CA3 区的损伤最为明显。尼氏体随着染毒剂量的增加而减少,提示细胞中蛋白的表达减少。以上结果提示长期砷暴露造成海马神经细胞病理改变,是导致学习记忆能力、行为能力等脑的高级功能活动降低的重要因素。

NGF 是迄今为止研究最为清楚的一个神经营养因子。在中枢神经系统中,NGF 主要分布于海马、大脑皮层、中隔、Broca 斜角带、迈内特氏核、嗅球及纹状体中间神经元的胆碱能神经元^[10]。其中,海马内 NGF 蛋白水平是整个脑 NGF 蛋白水平的 4 倍^[11]。NGF 是对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起调控作用的分子^[12],在神经元受到损伤时,能够发挥保护效应和促再生效应^[13,14]。本研究发现母体砷暴露后,子代大鼠海马 NGF mRNA 表达水平与对照组相比明显降低,提示孕期和哺乳期砷暴露,可引起 NGF 表达下降,其对神经保护和促再生效应减弱,从而影响子代中枢神经系统发育,造成子代学习记忆能力的下降。

GAP-43 是一种神经组织特异性磷酸蛋白质,广泛存在于神经组织中。GAP-43 被认为是与神经元生长、发育和再生过程有关的标志性蛋白^[15],主要存在于分化定性并开始轴突生长的神经元中,在子代大鼠出生后 5 d、15 d 及 30 d,中枢神经系统的不同脑区(大脑皮质、海马及小脑皮质)均有高水平的 GAP-43 表达,而此时正是轴突生长、延伸及终末分支形成突触的关键时期^[16]。GAP-43 与长期记忆相关的可塑性有关^[17]。长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)所引发的突触效能变化,可影响 GAP-43 的磷酸化状态和其 mRNA 的表达^[18]。孕期及哺乳期慢性铅暴露可导致子代大鼠空间学习能力下降,与脑海马 GAP-43 蛋白表达水平下降有关^[19]。本研究发现砷染毒后仔鼠大脑海马组织 GAP-43 mRNA 表达降低,提示砷可抑制 GAP-43 mRNA 的表达,可能与砷损害海马组织结构和形态,以及影响突触的可塑性和神经再生能力有关。

综上所述,大鼠在孕期和哺乳期进行饮水砷暴露,可以引起子代大鼠海马形态结构和海马神经元改变,干扰仔鼠脑海马区 NGF、GAP-43 mRNA 的表达,特别是以学习记忆密切相关的 CA1、CA3 区

损害最为明显,反映了砷暴露后,子代大鼠的中枢神经系统发育受到预制,从而导致了仔鼠的学习记忆能力等行为能力的异常。

参 考 文 献

- 1 孙贵范. 深入研究慢性砷中毒的分子作用机制. 中国地方病学杂志, 2004; 23(1): 1-2.
- 2 Wasserman GA, Liu XH, Parvez F, *et al.* Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihazar, Bangladesh. *Environ Health Persp*, 2004; 112(13): 1329-1334.
- 3 Calderon J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, *et al.* Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res*, 2001; 85(2): 69-76.
- 4 王天祥, 王正辉, 程晓天. 砷氟中毒地区儿童智力水平及生长发育调查与评价. 中国地方病学杂志, 2005; 24(2): 179-182.
- 5 赵凤红, 王 艳, 孙 迪等. 饮水砷暴露对儿童视觉简单反应时及联合型瑞文 IQ 值的影响. 环境与健康杂志, 2009; 26(12): 1037-1038.
- 6 席淑华, 孙贵范, 孙文娟等. 砷对仔代大鼠神经行为和学习记忆功能影响. 中国公共卫生, 2006; 22(5): 559-560.
- 7 Dudnan JT, Tsay D, Siegelbaum SA. A role for synaptic inputs at distal dendrites: instructive signals for hippocampal long-term plasticity. *Neuron*, 2007; 56(5): 866-879.
- 8 李国章. 神经生理学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 26-30.
- 9 姜招峰, 周 翔, 杨瀚仪. 海马及皮层的氧自由基损伤与大鼠学习能力与记忆能力的关系. 中国行为医学科学, 2001; 10(4): 286-288.
- 10 李家鑫, 曾 丽. 神经生长因子研究与周围神经损伤的治疗进展. 广西医学, 2007; 29(1): 60-62.
- 11 陈燕涛, 何清刘, 尚 礼. 神经生长因子治疗周围神经损伤的前瞻性研究. 中华创伤骨科杂志, 2006; 8(8): 744-746.
- 12 Ogawa S, Nabeshima T, Kameyama T, *et al.* Effects of nerve growth factor (NGF) in rats with basal forebrain lesions. *Jpn J Pharmacol*, 1993; 61(2): 141-144.
- 13 Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*, 1995; 18(7): 321-326.
- 14 Greene LA, Kaplan DR. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 1995; 5(5): 579-587.
- 15 Tolner EA, Van Vliet EA, Holtmaat AJ, *et al.* GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats. *Eur J Neurosci*, 2003; 17(11): 2369-2380.
- 16 帖立军, 潘建平, 宋天保等. GAP-43 在发育大鼠中枢神经系统的表达. 西安医科大学学报, 2001; 22(6): 499-501.
- 17 Akulinin VA, Belichenko PV, Dahlstrom A. The cellular distribution of GAP-43 immunoreactivity in human neocortical areas using immunofluorescence and confocal microscopy: post-ischemic influence. *Brain Res*, 1998; 784(1/2): 341-346.
- 18 Mori N, Morii H. SGG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging. *J Neurosci Res*, 2002; 70(3): 264-273.
- 19 田 琪, 王 洋, 刘正琦. 慢性铅暴露对大鼠 GAP-43 蛋白表达和学习记忆影响. 中国公共卫生, 2011; 27(1): 94-95.

(2012-06-21 收稿, 2012-09-24 修回)

编辑 沈 进