

低剂量铅对神经细胞粘附分子表达的影响研究

Study of the Impact of Low-level Lead on the Expression of Neural Cell Adhesion Molecule

胡前胜/HU Qian-sheng,任铁玲/REN Tie-ling,傅洪军/FU Hong-jun,董胜璋/DONG Sheng-zhang

中山大学公共卫生学院环境卫生学教研室,广州 510080

Department of Environmental Health, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

[摘要] 为了探讨神经细胞粘附分子(NCAM)在铅神经发育毒性中的作用,分别从体内、体外途径观察了低水平铅暴露对海马 NCAM 表达的影响。结果表明:铅明显抑制了海马神经元 NCAM 的表达,抑制程度随时间延长逐渐减弱,随剂量增加逐渐增强。提示:无论体内还是体外,低水平铅均显著抑制了 Wistar 大鼠海马 NCAM 的表达,并造成海马 NCAM 表达时程上的延迟。

[关键词] 铅;神经细胞粘附分子;海马;Wistar 大鼠

[中图分类号] Q593*2,Q355

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)05-0036

Abstract: To explore the role of neural cell adhesion molecule (NCAM) on the lead neurotoxicity, the impact of lead on the expression of NCAM was studied with Wistar rats in vitro and in vivo respectively. Results showed that in vivo PbCl₂ dose-responsively inhibited the expression of NCAM at 14 d, but till the 30 d, the pups' NCAM expression exceeded the control. The same trend of NCAM expression was observed in vitro. This study indicated that low-level lead significantly inhibited the expression of NCAM in Wistar rats' hippocampus especially at early development time and delayed it's expression phases.

Key Words: lead; neural cell adhesion molecule (NCAM); hippocampus; Wistar rat

CLC Numbers: Q593*2,Q355

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)05-0036-03

神经细胞粘附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)是免疫球蛋白超家族中的一个单链跨膜糖蛋白^[1],在神经系统发育尤其学习记忆形成和巩固过程中具有重要的作用^[2]。环境中低剂量的铅具有较强的以损害儿童学习记忆为主的神经发育毒性,因此 NCAM 在铅的神经发育毒性中的作用值得研究。本实验以 Wistar 大鼠为研究对象,分别从体内和体外两条途径观察了铅对海马 NCAM 表达的影响,为探讨铅的神经发育毒性机制提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

SPF 级健康 Wistar 大鼠,检疫 1 周后开始实验。雌鼠随机分成对照组、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L PbCl₂ 组。交配前 1 周开始给水(对照组)或 PbCl₂ 染毒至分娩。

1.1.2 主要试剂

NCAM 单克隆抗体、抑蛋白酶肽 Aprotinin、亮抑制肽 Leupeptin、苯甲基磺酰氟 PMSF 购自美国 Sigma 公司;二抗购自北京

中山生物技术有限公司;Phototope^R-HRP 免疫印迹检测试剂盒购自 New England Biolabs 公司;Neurobasal 培养基及 B27 添加剂购自 Gibco BRL 公司。

1.1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱(Shel LAB,USA),垂直电泳及转移系统(BioRad, USA),全自动图象分析系统(KONTRON IBAS2.0 德国),彩色图象摄录输入仪(ky-F30B 3-CCD, JVC, 日本),Axiotron 显微镜(ZEISS,德国)。

1.2 海马组织分离及固定

分层剪开胎鼠或乳鼠的头皮和颅骨,暴露两侧脑半球,分开颞叶皮层,暴露并取出海马回,置解剖液中;用解剖液清洗去除血污并剔除结缔组织后置 10%甲醛(临用现配)溶液中固定 2 h。

1.3 在体海马组织 NCAM 表达测定^[3]

制备石蜡切片;脱蜡至水、抗原修复、血清封闭后,滴加 1:50 的抗 NCAM 抗体置湿盒中放 4℃过夜;滴加 1:100 的专用抗小鼠二抗,37℃孵育 30 min;加 DAB 液进行显色反应,显微镜下观察显色情况,流水终止显色反应;苏木素复染细胞核;去离子水冲洗,梯度乙醇脱水,透明,封片。再进行图象摄录并输入全自动图

来稿日期:2005-09-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30271109,30371198),广东省科技计划项目(2004B33701005)

作者简介:胡前胜,男,广州市中山二路 74 号中山大学公共卫生学院环境卫生学教研室,副教授,主要从事神经毒理学和环境毒理学研究工作;E-mail: huqsh@mail.sysu.edu.cn

象分析系统,参考申洪^[4]所推荐的定量分析方法,计算阳性单位(positive unit, PU)。

1.4 海马神经元的分散、种植、培养

SPF 级孕 18 d Wistar 雌鼠经戊巴比妥麻醉后,剖腹取出胎鼠。分离胎鼠海马,消化、分散海马神经元,0.8×10⁶ 个细胞/L 的密度种植到 25 ml 培养瓶中,置 CO₂ 培养箱无血清培养。

1.5 细胞染毒

加入预先配好浓度的 PbCl₂ 各 30 μl,使各培养瓶中 PbCl₂ 的终浓度分别为 10⁻⁶ mmol/L、10⁻⁵ mmol/L、10⁻⁴ mmol/L、10⁻³ mmol/L、10⁻² mmol/L。每次换液时,补入相应量的 PbCl₂,维持其终浓度不变。另设 PBS 对照。

1.6 海马神经元 NCAM 表达的测定(Western blotting)

提取细胞总蛋白,经考马斯亮兰 G-250 染色法定量蛋白。灌制 7%分离胶和 5%浓缩胶,取 40 μg 总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转移到 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶封闭;与-抗(抗-NCAM)孵育 4℃过夜;加二抗室温孵育 1 h;发光显影,定影晾干,再用 IBAS 图像处理系统扫描测定感光区带光密度及计算积分光密度。

1.7 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS10.0 统计软件进行数据整理和 ANOVA 单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同发育时间仔鼠海马组织 NCAM 表达的情况

免疫组化检测仔鼠海马组织 NCAM 表达情况如图 1。镜下阳性细胞表现为胞核蓝色,表达 NCAM 的胞膜和突起则染成棕褐色。棕褐色密度越大,表示 NCAM 含量越高。结果显示海马神经元 NCAM 表达在第 14 天最高,以后随天龄增加,NCAM 表达逐渐降低。第 30 天达到观察时间内的最低水平。

2.2 宫内铅暴露对仔鼠海马组织 NCAM 表达的影响

不同剂量铅染毒的仔鼠不同天龄海马组织 NCAM 的表达情况见表 1、图 2。第 14 天仔鼠海马组织 NCAM 表达受铅的抑制最突出,表现出剂量-效应关系($p < 0.05$),至第 21 天其抑制作用就不明显,第 30 天 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 剂量组的海马 NCAM 表达反而比对照组和低剂量组升高。

2.3 原代培养的海马神经元 NCAM 表达时程

每天收集培养的海马神经元,提取蛋白定量后进行免疫印迹(Western blot)检测 NCAM 的表达,见图 2、表 2。培养第 1 天几乎看不到目的条带的出现;第 2 天开始出现目的条带,与蛋白分子量标志物 Marker 相比,条带位于 140~200 kD(见图 3);此后第 3 天、第 4 天、第 5 天均表现为密度最高、区域面积最大的蛋白条带;第 6 天目的蛋白条带的体积开始减小;第 8 天目的蛋白条带

的密度开始降低,直至第 10 天。

表 1 不同剂量 PbCl₂ 宫内暴露对海马组织 NCAM 表达的影响

Tbl. 1 PbCl₂ changed the pattern of NCAM expression in hippocampus of Wistar rats pups

PbCl ₂ /mmol/L	第 14 天	第 18 天	第 21 天	第 30 天
0	25.88±1.67	23.19±2.24	21.11±1.37	17.16±1.93
0.5	23.59±1.26	21.52±2.88	20.00±0.94	16.51±1.11*
1.0	14.10±1.22*	16.60±1.69*	19.93±0.87	20.13±1.38
2.0	9.33±1.49**	12.23±1.67**	17.78±0.61*	20.62±1.07



图 2 不同培养时间海马神经元 NCAM 的表达

Fig. 2 Western blot result of the expression of NCAM of hippocampal neurons at different culture times

表 2 不同培养时间海马神经元 NCAM 表达的积分吸光度结果

Tbl. 2 Result of the expression of NCAM of hippocampal neurons at different culture times

培养时间	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天
积分吸光度	13.87	414.78	2 580.90	2 573.20	2 542.14	2 062.85	1 897.06	1 574.60	1 606.99	989.02

2.4 低剂量铅对原代培养的海马神经元 NCAM 表达的影响

图 3 是不同染铅剂量下不同培养时间海马神经元 NCAM 表达的免疫印迹 Western blot 检测结果。从条带的密度和宽度来看,培养第 2 天,10⁻² mmol/L、10⁻³ mmol/L 及 10⁻⁴ mmol/L PbCl₂ 剂量组海马神经元 NCAM 的表达即出现了明显的降低;第 3~4 天,各组 NCAM 表达均明显增多,表现为出现致密且较宽的目的条带,而铅对 NCAM 的抑制作用也更明显且表现出显著的剂量-效应关系;第 5 天海马神经元中 NCAM 的表达在各组之间的差别不再显著,相反高剂量染铅组(10⁻² mmol/L、10⁻³ mmol/L 及 10⁻⁴ mmol/L PbCl₂)NCAM 的表达竟超过了对照组;第 6 天、第 7 天各组 NCAM 的表达都开始下降。

表 3 是用 IBAS 图象处理系统处理后计算获得的 NCAM 积分吸光度。由它可以定量地看出不同剂量不同时间 NCAM 表达的变化情况,可见各组 NCAM 表达的时间变化趋势基本一致,但 NCAM 表达的高峰出现了不同程度地抑制和延迟。

将各个时间点的对照组的 NCAM 表达量设为 100%,其他各组与之比较并进行作图,则如图 4 所示。图中同一时间的各点直接

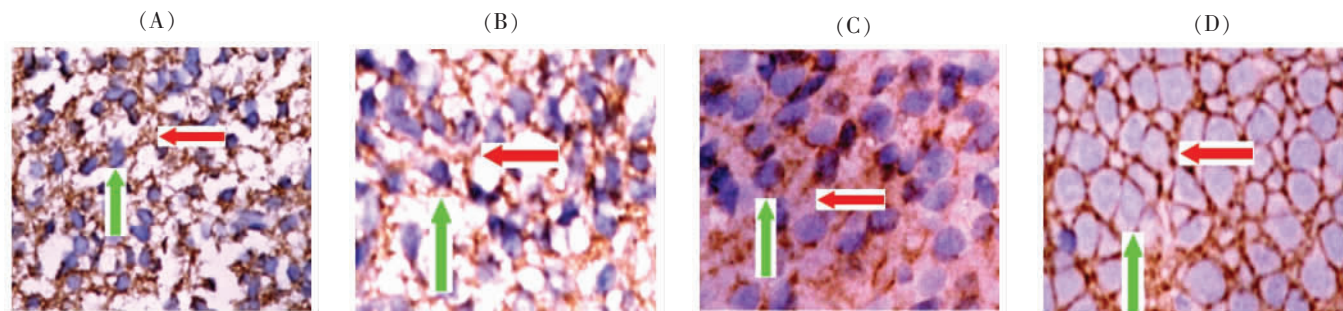


图 1 不同发育时间仔鼠海马组织 NCAM 的表达

(A)、(B)、(C)、(D)分别表示孕 14 d、孕 18 d、出生后 1 d 和 10 d。↑所示为神经元的胞体,核染成蓝色;←所示为神经元的轴突和树突,表达的 NCAM 染成棕色。

Fig. 1 The expression of NCAM in hippocampus of Wistar rat pups.

胡前胜,等:低剂量铅对神经细胞粘附分子表达的影响研究

反映了不同剂量的铅对原代培养的海马神经元 NCAM 表达的影响程度,而将各个时间点用散点图的形式连接起来,则反映出神经元 NCAM 表达受铅抑制作用的动态变化。可见铅一方面抑制了 NCAM 的表达,另一方面使 NCAM 的表达高峰时间出现了延迟。

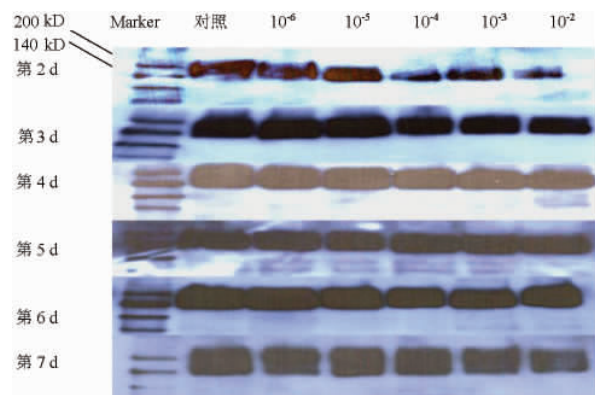


图 3 不同染毒剂量不同培养时间 $PbCl_2$ 对的海马神经元 NCAM 表达的影响

Fig. 3 Western blot result of the expression of NCAM of hippocampal nerons treated with different dosages of PbCl₂ at different culture times

表 3 不同染毒剂量不同培养时间 PbCl_2 对海马神经元 NCAM 表达的积分吸光度结果

Tbl. 3 Result of the expression of NCAM of hippocampal neurons treated with different dosages of PbCl₂ at different culture times

PbCl ₂ / mmol/L	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
对照组	850.74	2 479.91	2 735.13	2 349.75	2 471.28	1 875.18
10 ⁻⁶ mmol/L	491.78	2 003.49	2 345.89	2 461.29	2 464.23	1 435.81
10 ⁻⁵ mmol/L	687.49	2 093.68	2 337.01	2 056.23	2 076.65	1 619.16
10 ⁻⁴ mmol/L	175.52	1 329.00	1 776.39	2 474.21	1 801.44	1 403.96
10 ⁻³ mmol/L	362.01	1 525.89	1 632.85	2 237.54	2 039.14	1 032.78
10 ⁻² mmol/L	77.11	1 299.07	1 578.76	2 252.33	1 945.31	618.48

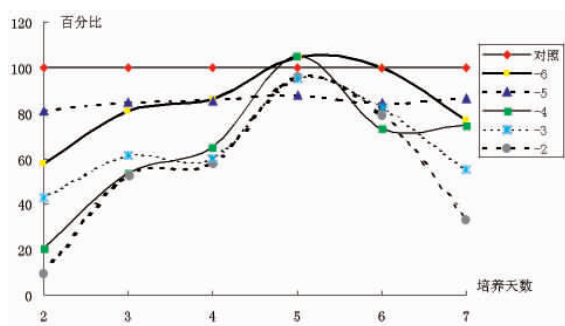


图 4 不同剂量 PbCl_2 作用下海马神经元 NCAM 表达时程与对照组比较曲线

注:标注中“-6、-5、-4、-3、-2”分别代表
 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} m mol/L PbCl₂ 剂量组”

Fig. 4 Time-dependently NCAM expression curves of different dosages of PbCl_2 compared with the control

3 讨论

环境中低浓度的铅一般不引起典型的铅中毒,而主要表现为以学习记忆损害为主的神经毒性。近年来,关于 NCAM 在学习记忆中的作用研究已成为新的热点,认为在学习记忆的形成、巩固和保持中均具有极其重要的作用^[5];在动物被动逃避学习实验中,

观察到活化的突触周围标记的 NCAM 增加^[6]; NCAM 缺失的小鼠导致谷氨酸性兴奋型突触的长时程增强 (long term potentiation-LTP) 受到抑制, 引起小鼠的学习和行为损害^[7]; NCAM 基因敲除小鼠其空间学习能力的持久性丧失^[8]; 还证实了在 LTP 形成和维持阶段 NCAM 参与诱导了学习记忆相关蛋白的合成以及在学习记忆的过程中 NCAM 介导了大量新的突触联结的形成^[9]。因此探讨铅对 NCAM 的影响可能对揭示铅的神经毒性机制提供重要线索。

本次实验以 Wistar 大鼠的胎鼠为实验对象,分别从体外和体内观察了海马组织和海马神经元 NCAM 的表达受铅的影响情况。研究发现低水平铅在发育早期可以明显抑制海马神经元 NCAM 的表达;随着培养时间的延长,出现对照组 NCAM 表达逐渐降低而染铅组 NCAM 表达反而逐渐增加的趋势,但各铅作用组 NCAM 的表达高峰始终低于对照组。我们推测 NCAM 表达模式的这种改变应该是铅一方面降低了 NCAM 的表达产量,另一方面延迟了 NCAM 正常的表达时间,导致 NCAM 表达时程发生了改变。

NCAM 的表达具有严格的时间性,决定着脑和神经系统结构和功能的正常发育和分化。实验证明 NCAM 在神经发育早期呈现高表达,随着神经系统发育的完成,NCAM 呈波浪型逐渐下降到很低水平^[1]。因此铅在早期抑制 NCAM 的表达,以后又造成 NCAM 表达时程的紊乱,进而造成铅对脑及神经系统结构和功能上的损害,这可能是铅神经发育毒性的一个重要机制。

同时, NCAM 表达后, 其细胞膜外区的唾液酸结合位点上会结合大量多聚唾液酸 (PSA), 在不同发育阶段, NCAM 通过结合或解离其上的 PSA 而调节自身的粘附强度^[10]。如果铅改变了唾液酸化的关键酶的活性, 使结合在 NCAM 上的多聚唾液酸不能随神经元发育而解离的话, 在 Western blotting 检测结果上也会出现总 NCAM 表达延迟的现象。因此, 铅导致的 NCAM 表达的这种滞后是铅对 NCAM 的直接延迟还是铅对唾液酸化过程的延迟仍需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] CROSSIN KL, KRUSHEL LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin in superfamily[J]. *Development Dynamics*, 2000, 218: 260-279.
- [2] ROMAN LC, BEREZIN V, BOCK E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2000, 18: 193-199.
- [3] MINANA R., CLIMENT E., BARETTINO D, et al. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development[J]. *J Neurochem*, 2000, 75: 954-964.
- [4] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89-91.
- [5] 胡前胜, 董胜璋, 陈学敏. 神经细胞粘附分子和学习记忆[J]. *卫生毒理学杂志*, 2003, 17(2): 71-73.
- [6] SKIBO GG, DAVIES HA, RUSAKOV DA et al. Increased immunogold labeling of neural cell adhesion molecule isoforms in synaptic active zones of the chick striatum 5~6 hours after one-trial passive avoidance training[J]. *Neuroscience*, 1998, 82(1): 1-5.
- [7] CREMER H, CHAZAL G, CARLETON A, et al. Long-term, but not short-term plasticity at mossy fiber synapse is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice[J]. 1998, 95(22): 13 242-13 247.
- [8] CREMER H, LANGE R, CHRISTOPH A, et al. Inactivation of the NCAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning[J]. *Nature*, 1994, 367: 455-439.
- [9] DEANNA LB, LYNN MS, LAWERNCE S, et al. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity [J]. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10: 473-482.
- [10] INOUE S, INOUE Y. Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains[J]. *J Bio Chem*, 2001, 276: 31 863.

(责任编辑 王 芷)