

母体铅暴露对仔鼠海马组织中 P2X7 受体表达的影响

李宁¹, 吕丰收², 张平安¹, 乔明武¹, 赵秋艳¹, 宋莲军¹, 李丽¹

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

(2. 河南医学高等专科学校病理学教研室, 河南郑州 450002)

摘要: 为探讨母体铅暴露对其仔一代小鼠的海马组织中 P2X7 受体蛋白表达的影响, 将雌性小鼠自妊娠第 1 d 起开始经饮水染铅 (0.1%、0.5% 和 1% 的浓度溶解在去离子水中, 对照组饮蒸馏水) 至仔鼠出生后 21 d 断乳为止。在出生后第 21 d, 随机抽取各组仔鼠, 分别采用石墨炉原子光谱吸收法测定血液和海马组织内铅的含量, 免疫组织化学和 Western blot 检测海马组织中 P2X7 受体蛋白的表达。各个铅暴露组中血铅水平和海马组织的铅含量要显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 铅暴露组中 P2X7 受体的表达显著增加 ($P < 0.05$)。母体铅暴露使铅在仔鼠体内蓄积, 提示血铅和海马组织中铅含量的升高, 从而引起海马组织中 P2X7 受体的过量表达, 可能会引起海马组织神经元的功能损伤, 进而损伤了神经系统, 引起神经毒性。

关键词: 铅; 海马组织; P2X7 受体; 神经毒性

文章编号: 1673-9078(2016)1-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.001

Maternal Lead Exposure Effects on the Expression of P2X7 Receptor in the Hippocampus of Mouse Pups

LI Ning¹, LV Feng-shou², ZHANG Ping-an¹, QIAO Ming-wu¹, ZHAO Qiu-yan¹, SONG Lian-jun¹, LI Li¹

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

(2. Henan Medical College Department of Pathology, Zhengzhou 451191, China)

Abstract: In order to investigate the effects of maternal lead (Pb) exposure on the expression of P2X7 receptor in the hippocampus of mouse offspring, female mice were administered Pb through their drinking water, from the first day of gestation until the pups were weaned, at 21 days of age. Lead acetate was dissolved in distilled deionized water at concentrations of 0.1%, 0.5%, or 1%. The control group received only distilled water. At postnatal day 21, blood and hippocampal Pb levels were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry, and the expression of P2X7 receptor in the hippocampus was examined by immunohistochemistry and western blotting. Blood and hippocampal Pb levels of all lead-exposure groups were significantly higher compared with the control group ($P < 0.05$). Additionally, the expression of P2X7 receptor was increased in Pb-exposed groups in comparison with the control group ($P < 0.05$). Maternal Pb exposure led to the Pb accumulation in mouse pups, and it increased Pb levels in the blood and hippocampus. Consequently, P2X7 receptor was overexpressed in the hippocampus of these pups, which may contribute to the dysfunction of hippocampal neurons, causing damage in the nervous system and neurotoxicity.

Key words: lead; hippocampus; P2X7 receptor; neurotoxicity

铅是生活环境中普遍存在的一种重金属, 对人体的各个系统和器官都有损伤作用, 其中危害最大的是神经系统, 可导致神经系统损伤包括铅毒性脑病、周围神经病变、听力障碍和认知缺陷等^[1]。孕期铅暴露可影响子代情感行为, 损害其学习和记忆能力^[2]。P2X 受体是通过细胞外腺苷 5'-三磷酸盐激活的作为门控细胞膜离子通道的嘌呤受体中的一个家族。P2X 受体包含七个指定的亚型, P2X1-P2X7^[3]。他们广泛分布在几乎每种起源细胞的大多数类型中, 并且, 它们参与

收稿日期: 2015-03-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31201878, U1204804)

作者简介: 李宁 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与卫生

许多反应, 如在末梢和中枢神经系统突触的传递, 平滑肌的收缩, 血小板聚集, 巨噬细胞的激活, 细胞死亡和免疫调节^[4]。P2X7 受体的一个独特的特性是它的激活可导致大型等离子体膜孔的形成, 这些膜孔不仅能通过离子, 而且能通过 900 Da 的亲水分子。最近的研究表明, P2X7-中介信号在缺血后和某些神经退行性疾病的过程中能够触发凋亡细胞死亡。在中枢神经系统 (Central Nervous System, CNS) 的小胶质细胞和雪旺细胞, 以及星形胶质细胞中已经发现了功能 P2X7 受体^[5]。研究表明, 新生大鼠缺氧缺血后 2 h, P2X7 受体在患侧皮层、白质和海马组织内表达下调^[6]。研究表明, 缺氧状态下, P2X7 受体可介导海马突

触前膜谷氨酸 Ca^{2+} 依赖性释放, 并且 P2X7 受体介导异丙酚对缺氧海马突触前膜谷氨酸 Ca^{2+} 依赖性释放的抑制作用^[7]。

因为针对鼠 P2X7 受体的抗体选择性较差, 而使 P2X7 受体在末梢或中心神经元的存在一直备受关注, 最近的进展发现了在鼠 P2X7 受体中极具改善活性的小分子受体拮抗剂^[6]。在鼠的末梢感觉神经节, P2X7 受体似乎有选择性的被定位在胶质细胞^[7]。P2X7 受体最好的特征活性是能促使从巨噬细胞和小胶质细胞中释放白细胞介素 1β (IL- 1β), 伴随着如细菌内毒素(脂多糖, Lipopolysaccharides, LPS) 类的物质的释放。

众所周知, 早期生活铅暴露可能对大脑发育造成严重的后果。然而, 铅暴露对大脑发育的潜在机理仍不清楚。本研究将通过检测母体铅暴露仔鼠海马中 P2X7 受体表达的影响, 来探讨铅神经毒性机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Tecan Sunrise 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司), Z-5000 型石墨炉原子吸收光谱仪(日本日立公司), Trans-Blot SD 半干电泳转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), Biosens 数字成像系统(上海山富科学仪器有限公司), Labscan 扫描控制和分析前处理软件(Amersham Biosciences 公司), Bio Imaging System 凝胶成像系统(美国 Gene 公司)。醋酸铅(PbAc, 洛阳生物化学试剂公司), 兔抗 P2X7 受体(美国 Santa cruz 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(美国 Santa cruz 公司), DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 蛋白 Marker(北京天根生化科技有限公司), 过氧化物酶标记的链酶卵白素(St-reptavidin/Peroxidase, SP) 试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物和处理

选择健康成年 SPF 级昆明小鼠 40 只, 体重 17 g-22 g, 由河南省动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK(豫) 2010-0002, 动物在环境相对湿度 50%~60%, 温度 18 °C~22 °C, 光照/黑暗分别为 12 h 的 SPF 级屏障环境内饲养, 每天 18:00 以雌:雄为 2:1 合笼, 次日 8:00 检查阴栓, 发现阴栓为受孕第 0 d。将孕鼠随机分为 4 组, 分别为对照(蒸馏水)组和低剂量(0.1% PbAc)、中剂量(0.5% PbAc)、高剂量(1% PbAc) 醋酸铅染毒组, 每组 10 只, 分笼饲养。分别于妊娠期和哺乳期(即妊娠第 1 d 至仔鼠出生 21 d) 采用自由饮水方式对

母鼠进行染毒。

1.2.2 在血液和海马样本中进行铅浓度测定

在仔鼠第 21 d 时, 乙醇清洁尾部, 断尾采取血液样本, 乙醚麻醉, 断头, 在冰上快速分离海马组织, 经消化后, 用 Z-5000 石墨炉原子吸收光谱仪测定铅含量。

1.2.3 免疫组化

提取海马组织, 恒冷切片机切片, 收集 10 μm 厚的切片。4% 多聚甲醛固定, 用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液、PBS、0.3% Triton X-100 和 5% 正常血清的混合液中浸泡 1 h。加入一抗, 单克隆抗体兔抗 P2X7 受体(1:100, Santa cruz), 4 °C 恒温箱中孵育。第 2 d, 用 0.01 mol/L PBS 冲洗后, 再加入二抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(稀释比为 1:1000) 的 0.01 mol/L PBS 中恒温孵育 2 h, 再用 DAB(含 0.003% H_2O_2 、0.03%、3,3-二氨基联苯胺)、0.05 mol/L Tris-HCl 的混合液(pH=7.6) 染色。最后用苏木精复染。图象分析和结果判定: 将脑组织切片置于德国 Lecia 显微照相系统显微镜下, 观察目的蛋白在仔鼠海马 CA1 区的定位及表达情况。全面观察每张切片, 每张切片随机选择 5 个具有代表意义的高倍视野($\times 400$) 对海马 CA1 区进行观察分析, 观察目的蛋白在仔鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区的定位及表达情况。以面密度(Area density) 和平均灰度(Average gray value) 的均值作为统计指标。面密度为目标总面积与统计场总面积之比, 表示阳性细胞的相对数量, 面密度越高, 说明阳性细胞数量越多; 该分析仪器的灰度级为 0-255 灰级, 纯黑色定为 0 级, 纯白色定为 255 级, 灰度级别和阳性细胞反应强度呈反相关, 平均灰度越高, 说明反应强度越低^[8]。

1.2.4 蛋白质分离和蛋白质印迹法

解剖海马组织样本在含 2% SDS, 10% 甘油, 2% 2-巯基乙醇, 溶解于 75 mM Tris-HCl 中的 0.002% 溴酚蓝的裂解缓冲液中匀浆。样品在 10% Tris/Glycine/SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分离之前先加热到 95 °C 并保持 10 分钟。蛋白质随后通过聚偏二氟乙烯膜, 并在 5% 牛奶中室温下封闭 2 h。一抗用兔抗 P2X7 受体抗体(1:1000, Santa cruz) 进行孵育 4 °C 过夜, 用 TBST 稀释辣根过氧化物酶羊抗兔抗体(1:10,000, Santa cruz) 后, 室温摇床上孵育 2 h, ECL 发光试剂盒显色, 曝光, 用 Bio imaging System 成像系统扫描蛋白条带后, 对 Western Blot 结果进行半定量分析。采用 bandscan V5.0 凝胶分析软件对 P2X7 受体和 β -actin 的灰度值进行分析, 以 P2X7 受体/ β -actin 作为 P2X7 受体的相对表达水平。

1.3 统计分析

所有实验数据用 SPSS 12.0 统计软件, 对实验数据进行处理, 采用单因素方差分析方法, 进行多样本均数之间的比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组仔鼠血液及海马组织中的铅含量

图 1 和图 2 显示了孕哺期铅暴露仔鼠血铅水平和海马组织的铅含量。相比于对照组, 铅暴露组的血液和海马组织中的铅水平有显著的增加 ($F=54.14$, $p<0.05$; $F=9.39$, $p<0.05$)。

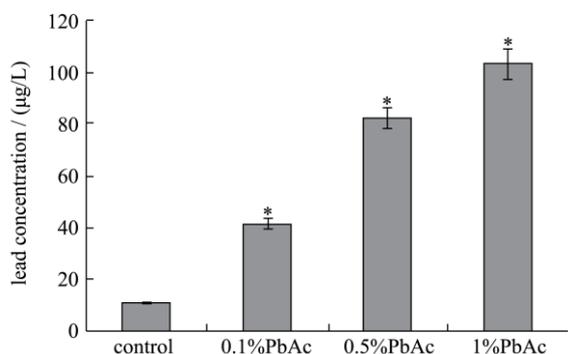


图 1 21 天对照组和铅暴露组中仔鼠血液的铅含量 (每组 10 只)

Fig.1 Blood Pb levels in control and Pb-exposed animals at PND21. (n = 10 per group)

注: $*p<0.05$ 。

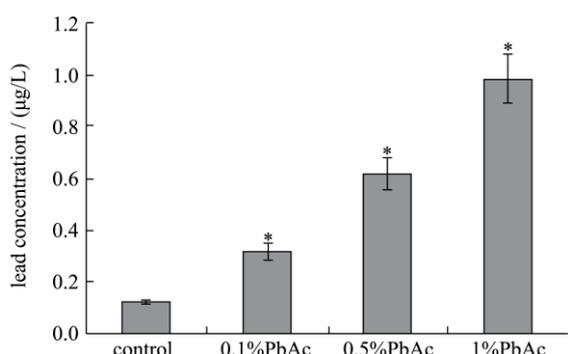


图 2 21 天对照组和铅暴露组中仔鼠海马组织的铅含量 (每组 10 只)

Fig.2 Hippocampal Pb levels in control and Pb-exposed animals at PND21 (n = 10 per group)

注: $*p<0.05$ 。

2.2 铅暴露对仔鼠海马组织中 P2X7 受体蛋白表达的影响

图3是P2X7受体的在对照组和1%醋酸铅组仔鼠

海马组织CA1, CA3和DG区免疫反应的结果。从图3和表1中我们可以看出, 与对照组相比, P2X7受体的在1%醋酸铅组仔鼠海马CA1和CA3免疫反应显著增加, 差异有统计学意义 ($p<0.05$), 但是在海马DG区, 差异无统计学意义 ($p>0.05$)。

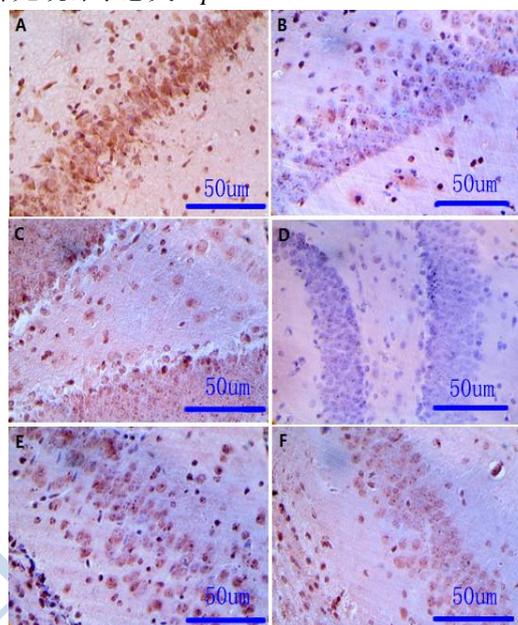


图 3 P2X7 受体在海马 CA1, CA3 和 DG 的免疫反应性

Fig.3 P2X7 receptor immunoreactivity in hippocampal regions CA1, CA3, and DG

注: (A, C, E) 1%醋酸铅组, (B, D, F) 对照组; (A, B) CA1 区, (C, D) CA3 区, (E, F) DG 区 (每组 n=3)。

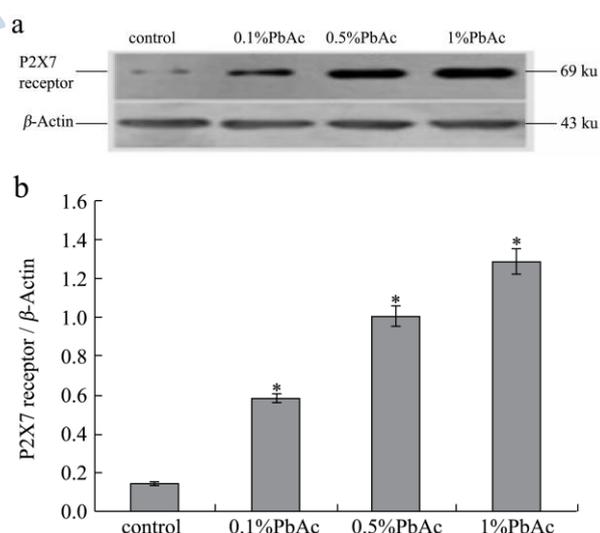


图 4 对海马组织中 P2X7 受体蛋白的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analyses of P2X7 receptor in hippocampal tissue

注: a 用 Western blot 分析不同组小鼠海马组织内 P2X7 受体蛋白, β 肌动蛋白作为载入对照; b 用 Western blot 分析不同组中 P2X7 受体表达水平。得到的值是 P2X7 受体蛋白与 β 肌动蛋白的强度比 (每组 n=10) ($p<0.05$)。

图4反应的是各组仔鼠海马组织中P2X7受体蛋白表达的半定量。图4a是Western blot的一个代表性结果。图4b反应的是不同组小鼠海马组织中P2X7受体的表达情况。从定量的结果来看,对照组中的P2X7受体的

蛋白水平较低,而其在0.1%, 0.5%和1%醋酸铅组中的表达水平要高于对照组,并且其具有统计学显著差异($F=63.81, p<0.05$)。

表1 P2X7受体在海马CA1, CA3和DG的免疫反应性($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 P2X7 receptor immunoreactivity in hippocampal regions CA1, CA3, and DG

组别	CA1		CA3		DG	
	面密度	平均灰度值	面密度	平均灰度值	面密度	平均灰度值
C	0.074±0.009*	208.27±30.02*	0.063±0.002*	210.02±19.23*	0.203±0.013	100.23±18.34
H	0.415±0.037	80.14±11.23	0.334±0.017	90.31±6.13	0.257±0.011	98.24±17.38
F	16.347	50.369	15.247	60.217	13.247	43.168
P	0.0011	0.013	0.001	0.014	0.091	0.103

注: ANOVA, 与对照组比较, * $p<0.05$ 。

3 结论

3.1 铅暴露的主要靶目标是神经系统,对处于发育期的大脑伤害尤其严重。铅中毒被认为是一种非常值得注意的一种儿童健康问题。神经系统是铅暴露造成伤害的主要靶目标,在胎儿时期极易受到这种损害^[9]。然而,母体铅暴露造成仔鼠神经毒性的机制仍未明确^[10]。

3.2 研究表明P2X7受体在中枢神经系统的突出传导过程中都发挥着重要功能。P2X7受体被认为是一种作为应答大脑受到急性损伤的调停物质,因为一旦底物定位,P2X7受体的合成就会迅速的增加来应答各种各样的刺激,包括海马组织的苔藓纤维末梢^[10]。P2X7受体应答各种信号级联,主要包括:迅速释放的起始反映和对包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IL-1 β 在内的促炎性细胞因子的加工^[11]。在近期的研究中,铅暴露组中,P2X7受体在海马组织中的表达较对照组的增高。

3.3 P2X7受体在小鼠的神经递质释放中起着明确的作用^[11],但是P2X7受体在导致神经中毒过程中的功能尚不清楚。在中枢神经系统中,P2X7受体的表达已经在活化的小胶质细胞,星形胶质细胞,突出前神经终端包括海马组织苔藓纤维终端中得到报道^[11]。报道称,增强的P2X7受体在神经胶质分数的表达,通过观察到铅暴露在不成熟的鼠脑中的结构表明星形细胞池参与病变。本研究结果表明,与对照组相比,铅暴露组仔鼠血液和海马组织内铅的水平显著增加;免疫组化结果显示,与对照组相比,P2X7受体的在1%醋酸铅组仔鼠海马CA1和CA3免疫反应显著增加,但是在海马DG区,差异无统计学意义;Western blot结果显示铅暴露组仔鼠海马组织内P2X7受体的表达上调。

3.4 研究表明,P2X7受体在海马神经元生理功能的发挥中起了一定的作用,而且可能参与谷氨酸能的传递失调和激活作用包括小胶质细胞和心形胶质细胞的活化作用^[11]。特别是,P2X7受体的活化作用或是超表达,被发现与运动神经元的毒性和运动神经元的损伤有关。在多发硬化动物模型中,ATP-P2X7受体的封锁有神经保护作用^[12],如舞蹈病^[13],阿尔茨海默病^[14],运动神经元损伤^[15]。在我们前期的水迷宫实验中,铅暴露组的学习记忆能力都比对照组的差^[16]。

3.5 结论指出,母鼠在孕期和哺乳期时的铅暴露,导致仔鼠海马组织中P2X7受体表达的增加。结果意味着,P2X7受体可能在早期铅暴露仔鼠海马组织中发挥着一定的作用,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Stansfield KH, Pilsner JR, Lu Q, et al. Dysregulation of BDNF-TrkB signaling in developing hippocampal neurons by Pb(2+): implications for an environmental basis of neurodevelopmental disorders [J]. Toxicol Sci., 2012, 127(1): 277-295
- [2] Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Rybicka M, et al. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders [J]. Neurol. Neurochir. Pol., 2012; 46(6): 569-578
- [3] Skaper SD, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders [J]. FASEB J., 2010, 24(2): 337-345
- [4] Yu Q, Guo Z, Liu X, et al. Block of P2X7 receptors could partly reverse the delayed neuronal death in area CA1 of the hippocampus after transient global cerebral ischemia [J]. Purinergic Signal, 2013, 9(4): 663-675
- [5] Sim, Joan A, Young MT, et al. Reanalysis of P2X7 receptor

- expression in rodent brain [J]. *J. Neuroscience*, 2004, 24(28): 6307-6314
- [6] 王丽雁,蔡文琴,陈鹏慧.P2X7 受体在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后表达下调[J].*第三军医大学学报*, 2009, 31(22): 2171-2174
- [7] 刘红亮,戴体俊.P2X7 受体介导异丙酚对缺氧海马突触前膜谷氨酸 Ca^{2+} 依赖性释放的抑制作用[J].*中国药理学通报*,2010,26(9):1169-1172
- [8] 李宁,宋莲军,刘芳丽,等.母体铅暴露对仔鼠海马组织中 P-tau 表达的影响[J].*环境科学学报*,2012,32(5):1206-1210
- [9] Nelson DW, Sarris K, Kalvin DM, et al. Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbonylhydrazide P2X7 antagonists [J]. *J. Med. Chem.*, 2008, 51(10): 3030-3034
- [10] Zhang XF, Han P, Faltynek CR, et al. Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglion [J]. *Brain Res.*, 2005, 1052(1): 63-70
- [11] Plusquellec P, Muckle G, Dewailly E, et al. The relation of low-level prenatal lead exposure to behavioral indicators of attention in Inuit infants in Arctic Quebec [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2007, 29(5): 527-537
- [12] Diaz-Hernandez M1, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, et al. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration [J]. *FASEB J.* 2009, 23(6): 1893-1906
- [13] Arbeloa J, Perez-Samartin A, Gottlieb M, et al. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia [J]. *Neurobiol. Dis.*, 2012, 45(3): 954-61
- [14] Peng W, Cotrina ML, Han X, et al. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(30): 12489-93
- [15] Ryu JK, McLamon JG. Block of purinergic P2X (7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease [J]. *Neuroreport*, 2008, 19(17): 1715-9
- [16] Li N, Zhao G, Qiao M, et al. The effects of early life lead exposure on the expression of insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) in the hippocampus of mouse pups [J]. *Food Chem Toxicol.*, 2014, 63: 48-52