· 实验研究 ·

亚慢性镧暴露对大鼠海马氨基酸类神经递质表达影响*

郑琳琳，张峻营，高洁，张树娟，徐英，郑双燕

摘　要：目的　探讨镧对大鼠神经行为影响及海马组织氨基酸类神经递质释放的改变。**方法**　健康成年雌性 Wistar 大鼠 24 只，随机分为对照组及低、中、高剂量染镧组（0.25%、0.50%、1.00% $LaCl_3$），仔鼠自母鼠怀孕至断乳后 1 个月饮用不同剂量氯化镧；穿梭箱实验检测仔鼠神经行为改变，高效液相色谱法检测仔鼠海马中兴奋性氨基酸递质及抑制性氨基酸递质含量。**结果**　与对照组比较，中、高剂量染镧组仔鼠接受电击时间、主动逃避潜伏期时间［分别为（26.00 ± 8.11）、（36.38 ± 5.88）与（6.50 ± 2.45）、（9.38 ± 3.50）s］］均延长，差异有统计学意义（$P < 0.05$），表现出学习记忆损伤；与对照组比较，中、高剂量染镧组仔鼠海马兴奋性氨基酸递质谷氨酸（Glu）、天冬氨酸（Asp）含量［分别为（8.16 ± 2.16）、（12.05 ± 4.86）与（8.91 ± 3.48）、（12.33 ± 4.57）μmol/gpro］升高，中、高剂量染镧组仔鼠海马抑制性氨基酸递质甘氨酸（Gly）、γ－氨基丁酸（GABA）、牛磺酸（Tau）含量［分别为（9.95 ± 3.41）、（13.25 ± 5.03）、（10.93 ± 3.53）、（14.50 ± 4.90）与（10.10 ± 3.18）、（13.78 ± 5.28）μmol/gpro］升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；呈剂量效应关系。**结论**　亚慢性镧染毒可导致仔鼠学习记忆能力下降，其机制可能与仔鼠海马组织内兴奋性及抑制性氨基酸神经递质含量升高有关。

关键词：镧；海马；神经递质；学习记忆

中图分类号：R 114　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2017)03-0457-04　DOI：10.11847/zgggws2017-33-03-30

Effect of subchronic lanthanum exposure on amino acid neurotransmitters in hippocampi of offspring rats

ZHENG Lin-lin, ZHANG Jun-ying, GAO Jie, et al (*Institute of Molecular Medicine, School of Medicine, Eastern Liaoning University, Dandong, Liaoning Province* 118000, China)

Abstract: Objective　To investigate the effect of lanthanum on neurobehavioral ability and amino acid neurotransmitter contents in hippocampal tissues of offspring rats. **Methods**　Healthy female adult Wistar rats were randomly divided into control, low, moderate, and high dose groups (6 rats in each group) and exposed to 0, 0.25%, 0.50%, and 1.00% lanthanum chloride ($LaCl_3$) in drinking water from pregnancy to one month after weaning. The offspring rats of the experimental Wistar rats were also treated with various dosages of $LaCl_3$ in drinking water till one month after weaning. Shuttling boxes assay was used to assess neurobehavioral changes in offspring rats of the experimental rats; high performance liquid chromatography was used to detect the levels of excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in hippocapi of the offspring rats. **Results**　The shock time and active escape latencies were 26.00 ± 8.11s and 6.50 ± 2.45 s for the offspring rats of moderate dose group, and 36.38 ± 5.88 s and 9.38 ± 3.50 s for those of high dose group, respectively, which were significantly prolonged when compared with those of the offspring rats of control group (all $P < 0.05$), suggesting learning and memory damage of the offspring rats of exposure groups. The levels of glutamate (Glu) and aspartate (Asp), both being excitatory amino acid neurotransmitters, were 8.16 ± 2.16 μmol/gpro and 12.05 ± 4.86 μmol/gpro in the hippocapi of offspring rats of moderate exposure group and 8.91 ± 3.48μmol/gpro and 12.33 ± 4.57 μmol/gpro in those of high exposure group, respectively, which were significantly increased compared with those of the offspring rats of the control group (all $P < 0.05$). The levels of glycine (Gly), γ-aminobutyric acid (GABA), and taurine (Tau), all being inhibitory amino acid neurotransmitter, were 9.95 ± 3.41μmol/gpro, 13.25 ± 5.03 μmol/gpro, and 10.93 ± 3.53 μmol/gpro and 14.50 ± 4.90 μmol/gpro, 10.10 ± 3.18 μmol/gpro, and 13.78 ± 5.28 μmol/gpro for the offspring rats of moderate and high dose exposure groups, respectively, which were significantly increased in dose-effect manner compared to those of the offspring rats of the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion**　Maternal subchronic lanthanum exposure could lead to learning and memory damage in offspring rats, which may be related to the elevation of excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in hippocampal tissues.

Key words: lanthanum; hippocampus; neurotransmitter; learning and memory

随着稀土元素（rare earth element, REE）广泛应用于不同行业，环境中的稀土元素不断增加，进入人体并在组织器官中积累。流行病学调查发现少年儿童对于稀土元素的神经毒性非常敏感[1]。镧是一种广泛使用的稀土元素，研究表明镧可以进入脑内并蓄积，导致神经系统损伤和功能异常[2]。氨基酸

* **基金项目：**辽宁省博士启动基金（201501134）；辽东学院博士启动基金（2014003）；国家级大学生创新创业计划项目（201511779003）；辽东学院校级基金（2015JC006）

作者单位：辽东学院医学院分子医学研究室，辽宁 丹东 118000

作者简介：郑琳琳（1978－），女，辽宁凌源人，副教授，博士，研究方向：神经毒理及环境毒理。

数字出版日期：2016－4－27 13:34

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160427.1334.018.html

类神经递质包括兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸，谷氨酸（glutamic acid，Glu）、天冬氨酸（aspartic acid，Asp）是 2 种主要兴奋性氨基酸，甘氨酸（glycine，Gly）、牛磺酸（taurine，Tau）及 γ－氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）是 3 种重要的抑制性氨基酸，它们是中枢神经系统内的主要氨基酸类神经递质，参与调节突触信号传递，发挥调节学习、记忆等作用。本研究通过观察亚慢性氯化镧暴露后仔鼠海马组织中兴奋性和抑制性氨基酸神经递质含量变化，探讨亚慢性镧暴露对神经细胞毒性作用机制，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　氨基酸标准品 Glu、Asp、Gly、GABA、Tau（美国 Sigma 公司），邻苯二甲醛（美国 Sigma 公司），醋酸钾（分析纯，天津市光复精细化工研究所），甲醇（色谱纯，山东禹王实业有限公司化工分公司）；高效液相色谱仪（美国惠普公司），C18 色谱柱（大连依利特有限公司），超声波细胞粉碎机（宁波新艺超声设备有限公司），穿梭箱（安徽淮北正华生物仪器设备有限公司）。

1.2　实验动物　健康雌、雄性 Wistar 大鼠购自中国医科大学实验动物中心，动物生产许可证号：SCXK（辽）2013－0001，使用许可证号：SYXK（辽）2013－0007，体重（260 ± 10）g。实验动物室温度 17～23 ℃，相应湿度 45%～55%。将雌雄大鼠按 1∶1同笼交配，发现阴栓者定为受孕，记为妊娠第 0 天，孕鼠单笼饲养并自由摄水。随机将雌鼠分为对照组（饮用蒸馏水），低、中、高剂量染镧组（饮用含 0.25%、0.50%、1.00% $LaCl_3$ 的蒸馏水溶液），每组 6 只。子代大鼠在断乳前经由母体血循环和吸吮母乳染镧，断乳后则通过自行饮水摄入，至断乳后 1 个月结束[3]。

1.3　穿梭箱实验　设定穿梭箱刺激电流 1.2 mA，蜂鸣时间 10 s，间隙时间 20 s，电击时间 5 s，循环次数 20 次。实验开始后，穿梭箱内双侧分别发射红外光线，仔鼠若位于箱中央，当其挡住两侧任一光线时，该次穿梭即告结束；若在右侧，则必须挡住左侧光线才算完成 1 次穿梭，反之亦然。在峰鸣阶段完成穿梭称为主动回避，在电刺激阶段完成穿梭称为被动回避，循环 20 次结束。每天训练 2 轮，连续 5 d。训练结束后间隔 1 周，在相同条件下再次将仔鼠放入穿梭箱内，记录电击次数、电击时间和主动逃避潜伏期[4]。

1.4　高效液相色谱荧光检测氨基酸含量　海马组织称重 0.1 g，加 9 倍预冷生理盐水匀浆 5 min，冰浴下超声海马组织，3 00 r/min，4 ℃离心 20 min，取上清，稀释 10 倍，吸取 1 μL 稀释液以考马斯亮蓝法测定海马蛋白质含量。另取上清，10 000 r/min，4 ℃高速离心 20 min 后，稀释 50 倍取 100 μL，加邻苯二甲醛衍生试剂 200 μL，混匀静置 2 min 后，进样 20 μL。吸取标准液或样品上清液，加入氢氧化钠溶液邻苯二甲醛衍生试剂，混匀静置后进样。色谱条件：C18 色谱柱（150 mm×4.6 mm×5 μm），柱温 35 ℃。流动相 A：甲醇。流动相 B：0.1 mol/L 醋酸钾溶液，pH＝5.89，醋酸调节流动相 B 的 pH 值。A 相梯度洗脱条件为 0～2 min，20%～47%；2～11 min，47%～53%；11～14 min，53%～100%；14～19 min，100%～100%；20 min，20%；平衡 5 min，25 min 结束洗脱。荧光检测器，激发波长 λ ex＝250 nm，发射波长 λ em＝395 nm，峰面积用外标法定量[5]。氨基酸含量以 μmol/gpro 表示。

1.5　统计分析　实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析，应用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验，采用最小显著差异 t 检验法进行 2 组间差异的显著性检验。当 $P<0.05$ 时，表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　镧对仔鼠生长发育影响（表 1）　与对照组比较，中、高剂量 lanthanum chloride（$LaCl_3$）组仔鼠体重降低；高剂量 $LaCl_3$ 组仔鼠体重低于中剂量 $LaCl_3$ 组；各组仔鼠脏器系数无明显差异。

表 1　染镧对仔鼠体重及脏器系数影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别（%）	体重（g）	全脑系数（%）	海马系数（%）	皮质系数（%）
对照组	203.12 ± 16.78	1.00 ± 0.27	0.084 ± 0.009	0.47 ± 0.03
$LaCl_3$ 组 0.25	193.75 ± 10.83	0.91 ± 0.31	0.075 ± 0.004	0.47 ± 0.04
0.50	153.88 ± 6.77[ab]	0.97 ± 0.11	0.075 ± 0.006	0.48 ± 0.05
1.00	124.88 ± 5.94[abc]	0.97 ± 0.10	0.078 ± 0.007	0.48 ± 0.03

注：与对照组比较，a $P<0.05$；与 0.25% $LaCl_3$ 组比较，b $P<0.05$；与 0.5% $LaCl_3$ 组比较，c $P<0.05$。

2.2　镧对仔鼠学习记忆能力影响（表 2）　与对照组比较，中、高剂量染镧组仔鼠电击时间、主动逃避潜伏期延长，差异有统计学意义（$P<0.05$）；高剂量染镧组仔鼠电击时间、主动逃避潜伏期长于中、低剂量染镧组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

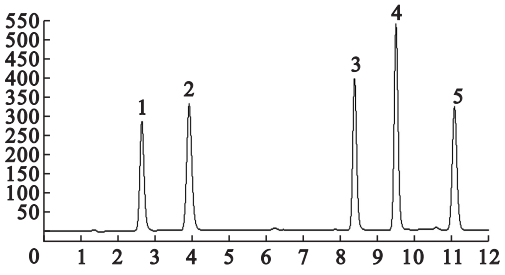
表 2　镧对仔鼠电击时间、主动逃避潜伏期影响（s，$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别（%）	电击时间	主动逃避潜伏期	
对照组		15.38 ± 5.78	2.00 ± 0.76
$LaCl_3$ 组	0.25	19.75 ± 7.17	4.25 ± 1.04
	0.50	26.00 ± 8.11[a]	6.50 ± 2.45[a]
	1.00	36.38 ± 5.88[abc]	9.38 ± 3.50[abc]

注：与对照组比较，a $P<0.05$；与 0.25% $LaCl_3$ 组比较，b $P<0.05$；与 0.5% $LaCl_3$ 组比较，c $P<0.05$。

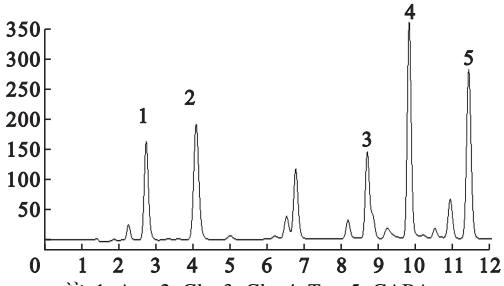
中国公共卫生 CPH

2.3　氨基酸神经递质色谱图(图 1、2)　在本实验条件下,5 种氨基酸可良好分离,保留时间分别为 Asp:2.7 min, Glu:4.0 min, Gly:8.5 min, Tau:9.6 min, GABA:11.1 min。



注:1:Asp;2:Glu;3:Gly;4:Tau;5:GABA。

图 1　氨基酸标准品色谱图



注:1:Asp;2:Glu;3:Gly;4:Tau;5:GABA。

图 2　仔鼠海马组织中不同氨基酸递质色谱图

2.4　镧对仔鼠脑海马组织中氨基酸神经递质含量影响(表 3)　与对照组比较,中、高剂量染镧组仔鼠海马组织中兴奋性氨基酸递质 Glu、Asp 含量升高,抑制性氨基酸递质 Gly、GABA、Tau 含量也升高,差异有统计学意义($P<0.05$);呈剂量效应关系。

表 3　镧对仔鼠海马组织中不同氨基酸递质含量影响(μmol/gpro, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别(%)		Glu	Asp	Gly	GABA	Tau
对照组		4.24 ± 0.39	4.98 ± 1.33	5.38 ± 0.93	6.78 ± 1.26	5.41 ± 0.84
$LaCl_3$ 组	0.25	5.50 ± 0.47	5.85 ± 1.09	6.61 ± 1.42	7.59 ± 1.66	6.70 ± 1.51
	0.50	8.16 ± 2.16[a]	8.91 ± 3.48[ab]	9.95 ± 3.41[ab]	10.93 ± 3.53[ab]	10.10 ± 3.18[ab]
	1.00	12.05 ± 4.86[abc]	12.33 ± 4.57[abc]	13.25 ± 5.03[abc]	14.50 ± 4.90[abc]	13.78 ± 5.28[abc]

注:与对照组比较,a $P<0.05$;与 0.25% $LaCl_3$ 组比较,b $P<0.05$;与 0.5% $LaCl_3$ 组比较,c $P<0.05$。

3　讨　论

流行病学调查发现婴幼儿发中稀土元素含量明显高于母亲,可能与孕妇摄入的稀土元素能够通过胎盘屏障进入胎儿体内,使胎儿暴露于宫内高稀土环境中有关;胎儿出生后,可通过包括乳汁在内的各种途径继续吸收稀土元素,而且婴幼儿消化道对稀土元素的吸收率高而络和促排效果较成人差,因此,婴幼儿暴露于稀土的机会可能高于成人,会伴发更大危害[6]。研究显示,镧也可通过胎盘和哺乳进入仔鼠体内[7],可能与幼年动物肠壁发育不健全导致镧吸收量较多有关;氯化镧染毒大鼠,大脑皮质、小脑和海马中出现较高的镧蓄积,同时大鼠学习记忆能力损伤[8]。本研究结果显示,中、高剂量染镧组仔鼠电击时间、主动逃避潜伏期明显长于对照组,且呈剂量效应关系。提示,染镧可致仔鼠学习记忆能力下降。

Glu 和 Asp 是中枢神经系统内最主要的兴奋性神经递质,对突触前、后神经元起到兴奋调节作用,其释放增加可导致神经兴奋性毒性作用[9]。而 Gly、GABA 和 Tau 对突触传递主要起抑制作用,以防止神经元的过度兴奋[10]。Gly 和 GABA 均是突触后抑制递质,GABA 是突触前抑制递质,介导抑制性突触的信息传递,Gly 通过激活 GABA 受体而发挥其生物学效应,使细胞处于超级化状态,防止细胞异常兴奋[11]。Tau 是组织细胞内含量丰富的一种自由氨基酸,在中枢神经系统中的作用类似于 GABA,同样发挥神经兴奋的抑制功能。Tau 具有促进神经系统生长发育和增殖分化、增强大鼠学习记忆等作用[12]。有研究显示,Tau 可对抗 Glu 的神经兴奋作用,减轻神经细胞过度兴奋后导致的细胞凋亡反应[13]。海马内兴奋性氨基酸神经递质与抑制性氨基酸神经递质的平衡状态,有助于维护神经细胞正常功能。如果二类氨基酸神经递质释放异常,可能严重干扰突触信息的正常传递。当兴奋性氨基酸递质大量释放时,抑制性氨基酸递质的释放也随之增加,但当兴奋性神经递质含量增加幅度过大时,抑制性氨基酸递质难以抵消其作用,即造成神经元的调控功能发生障碍,进而引起神经细胞凋亡、学习记忆能力下降。

本研究结果显示,中剂量染镧组仔鼠海马 Glu、Asp、Gly、GABA、Tau 含量高于对照组,仔鼠回避反射学习记忆能力也低于对照组;高剂量染镧组仔鼠海马 Glu、Asp、Gly、GABA、Tau 含量均进一步升高,仔鼠回避反射学习记忆能力则进一步下降,呈明显剂量效应关系。由此推测,镧可能通过神经递质代谢异常机制造成神经细胞损伤,引发神经细胞凋亡,从而造成学习记忆能力下降。

中国公共卫生 CPH

参考文献

[1] 范广勤,袁兆康,郑辉,等. 儿童稀土暴露的健康研究[J]. 卫生研究,2004,33(1):23 – 28.

[2] Feng L, Xiao H, He X, et al. Neurotoxicological consequence of long-term exposure to lanthanum[J]. Toxicol Lett, 2006, 165: 112 – 120.

[3] 郑琳琳,蔡原,于飞,等. 亚慢性镧暴露对仔鼠海马核转录因子 – κB 表达的影响[J]. 中国公共卫生,2015,31(1):92 – 94

[4] 郑琳琳. 镧对大鼠回避学习能力的影响[J]. 辽东学院学报,2015,22(1):54 – 56.

[5] 桂莉,田洪,郑健,等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中 4 种氨基酸类神经递质[J]. 第三军医大学学报,2009,8(8):675 – 678.

[6] 彭瑞玲,潘小川,解清. 稀土矿区婴幼儿与其母亲头发中稀土含量的研究[J]. 中华预防医学杂志,2003,37(1):20 – 22.

[7] Yang J, Liu Q, Zhang L, et al. Lanthanum chloride impairs memory, decreases pCaMK IV, pMAPK and pCREB expression of hippocampus in rats[J]. Toxicol Lett, 2009, 190(2):208 – 214.

[8] Zheng L, Yang J, Liu Q, et al. Lanthanum chloride impairs spatial learning and memory, downregulates NF-κB signalling pathway in rats[J]. Archives of Toxiclogy, 2013, 87(12):2105 – 2117.

[9] Krüger K, Repges H, Hippler J, et al. Effects of dimethylarsinic and dimethylarsinous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of young and adult rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 225:40 – 46.

[10] Scolari MJ, Acosta GB. D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glial language[J]. Amino Acids, 2007, 33:363 – 374.

[11] Treiman DM. GABA ergic mechanisms in epilepsy[J]. Epilepsia, 2001, 42:8.

[12] 梁尚栋,李焕英. 牛磺酸在神经系统中的生理作用和病理作用[J]. 国外医学:生理、病理学与临床分册,2002,22(1):76 – 77.

[13] Idrissi AE, Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism[J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience, 1999, 19(21):9459 – 9468.

收稿日期: 2015 – 12 – 08　　(解学魁编辑　张翠校对)

· 实验研究 ·

不同乳腺癌细胞体外侵袭力差异及影响因素*

邸大琳[1],王丽娜[1],付晓燕[1],魏兵[1],王会东[2],鞠吉雨[1]

摘　要:目的　探讨不同乳腺癌细胞系体外侵袭能力的差异并筛选其影响基因。**方法**　以 2 种常见的乳腺癌细胞系 MCF-7(低转移株)和 MDA-MB-231(高转移株)为研究对象,通过细胞划痕实验、细胞黏附实验以及 Transwell 侵袭实验分析 2 种乳腺癌细胞体外侵袭能力差异,实时荧光定量 PCR 筛选肿瘤侵袭转移相关基因在细胞间的表达差异并采用细胞免疫组化 SP 法进一步确认。**结果**　MDA-MB-231 细胞 24、48 h 的平均迁移距离分别为(218.75 ± 20.16)、(211.50 ± 16.54) μm,明显高于 MCF-7 细胞的迁移距离[分别为(130 ± 29.62)、(119.50 ± 25.65) μm](*P* < 0.01);MDA-MB-231 细胞黏附能力明显高于 MCF-7 细胞;MDA-MB-231 细胞 24 h 平均穿膜细胞数[(57.75 ± 4.19)个]明显多于 MCF-7 细胞[(35.50 ± 4.20)个](*P* < 0.01);实时荧光定量 PCR 结果显示,与 MCF-7 细胞比较,MDA-MB-231 细胞中细胞间黏附分子 1(ICAM-1)及乳腺癌候选抑制蛋白 1(BCSC-1)表达水平[分别为(0.09 ± 0.01)、(0.15 ± 0.03)]均明显降低(*P* < 0.01),而基质金属蛋白酶 14(MMP-14)表达水平(14.43 ± 1.01)明显升高(*P* < 0.01)。细胞免疫组化结果显示,MDA-MB-231 细胞 ICAM-1 以及 BCSC-1 的表达水平明显低于 MCF-7 细胞,而 MMP-14 表达水平明显高于 MCF-7 细胞。**结论**　乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的体外侵袭能力明显高于 MCF-7 细胞,细胞侵袭力可能与细胞内 ICAM-1、BCSC-1 低表达及 MMP-14 高表达有关。

关键词:乳腺癌;侵袭能力;细胞间黏附分子 1(ICAM-1);乳腺癌候选抑制蛋白 1(BCSC-1);基质金属蛋白酶 14(MMP-14)

中图分类号:R 737.9　**文献标志码:**A　**文章编号:**1001-0580(2017)03-0460-05　DOI:10.11847/zgggws2017-33-03-31

Difference in invasive ability *in vitro* of different breast cancer cell lines and its influencing factors

DI Da-lin*, WANG Li-na, FU Xiao-yan, et al (* *Department of Immunology, Weifang Medical University, Weifang, Shandong Province* 261053, China)

Abstract: Objective　To investigate the difference in invasion ability *in vitro* of different breast cancer cell lines and to screen genes associated with the difference. **Methods**　Two common breast cancer cell lines (MDA-MB-231 [high metastatic potential] and MCF-7[low metastatic potential]) were used in the study. The invasion ability of the two cell lines was evaluated with wound healing assay, cell adhesion assay, and transwell assay; real-time fluorescence

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81373185);山东省自然科学基金联合专项(ZR2014HL058);山东省医药卫生科技发展项目(2014WS0462);潍坊医学院公派教师国内访学资金(2015)

作者单位: 1. 潍坊医学院免疫学教研室,山东 潍坊 261053; 2. 潍坊市人民医院乳腺外科

作者简介: 邸大琳(1977 –),男,山东五莲人,讲师,硕士,主要从事抗肿瘤免疫研究工作。

通讯作者: 鞠吉雨,E-mail:jujiyu@163.com;王会东,E-mail:wcd2001001@hotmail.com

数字出版日期:2016 – 4 – 27 13:04

数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160427.1304.004.html