

氟、砷染毒对大鼠脑组织 CREB mRNA 及蛋白表达的影响

苏菁^{1a, 2}, 李明艳^{1a, 2}, 蒋守芳^{1a, 2}, 张艳淑^{1a, 2}, 姚三巧^{1a, 2}, 金玉兰^{1a, 2}, 沈福海^{1a, 2}, 李宏杰^{1b}

摘要: [目的] 探讨氟、砷及其联合染毒对大鼠脑组织中转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)的影响。

[方法] 将32只初断乳SPF级雄性SD大鼠随机分为4组: 对照组, 氟处理组、砷处理组和联合染毒组, 每组8只。对照组自由饮用蒸馏水, 氟、砷处理组和联合染毒组分别自由饮用120 mg/L 氟化钠、70 mg/L 亚砷酸钠、120 mg/L 氟化钠 + 70 mg/L 亚砷酸钠水溶液, 染毒3个月。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测 CREB 基因 mRNA 表达水平, 蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测 CREB、磷酸化 CREB(p-CREB)的蛋白表达水平。[结果] 氟、砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织 CREB mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.05$)。联合染毒组大鼠海马组织 CREB mRNA 表达水平低于氟、砷处理组($P < 0.05$)。氟、砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织 p-CREB 的表达水平分别为(0.68 ± 0.16 、 0.68 ± 0.15)、(0.46 ± 0.13 、 0.48 ± 0.11)、(0.38 ± 0.11 、 0.31 ± 0.14), 均低于对照组(0.83 ± 0.06 、 0.80 ± 0.11) ($P < 0.05$); 砷处理组大鼠大脑皮质、海马组织 p-CREB 蛋白表达水平平均低于氟处理组($P < 0.05$); 联合染毒组大鼠海马组织 p-CREB 蛋白表达水平低于氟、砷处理组($P < 0.05$)。[结论] 氟、砷及其联合作用可导致大鼠大脑皮质、海马组织 CREB 基因和磷酸化蛋白表达水平降低。

关键词: 氟; 砷; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; mRNA

Effects of Individual and Combined Exposure to Fluoride and Arsenic on Expression of CREB mRNA and Protein in Rat Brain SU Jing^{1a, 2}, LI Ming-yan^{1a, 2}, JIANG Shou-fang^{1a, 2}, ZHANG Yan-shu^{1a, 2}, YAO San-qiao^{1a, 2}, JIN Yu-lan^{1a, 2}, SHEN Fu-hai^{1a, 2}, LI Hong-jie^{1b} (1.a.School of Public Health b.School of Basic Medical Science, Hebei United University, Hebei 063000, China; 2.Hebei Laboratory of Coal Mine Health and Safety, Hebei 063000, China). Address correspondence to JIANG Shou-fang, E-mail: jiangshoufang@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effects of individual and combined exposure to fluoride and arsenic on cAMP response element binding protein (CREB) in brain of rats. [Methods] Thirty-two male Sprague-Dawley rats at the beginning of weaning were randomly divided into 4 groups: 3 groups of rats were exposed to 120 mg/L sodium fluoride (NaF), 70 mg/L sodium arsenite (NaAsO₂), or 120 mg/L NaF + 70 mg/L NaAsO₂ mixed solution for 90 days, respectively; 1 control group of rats drank distilled water for 90 days. The mRNA expression levels of CREB and protein expression levels of CREB and phosphorylated CREB (p-CREB) in cerebral cortex and hippocampus of rats were detected by real-time polymerase chain reaction and Western blot assay, respectively. [Results] Compared with the controls, the CREB mRNA expression levels in cerebral cortex and hippocampus in the 3 exposure groups were markedly decreased ($P < 0.05$). The CREB mRNA expression level in hippocampus of co-exposed rats was lower than that in the NaF-exposed or NaAsO₂-exposed rats. The p-CREB protein expression levels in cerebral cortex and hippocampus were 0.68 ± 0.16 and 0.68 ± 0.15 respectively for the NaF-exposed rats, 0.46 ± 0.13 and 0.48 ± 0.11 for the NaAsO₂-exposed rats, as well as 0.38 ± 0.11 and 0.31 ± 0.14 for the co-exposed rats, respectively; all were significantly lower than those of the controls (0.83 ± 0.06 , 0.80 ± 0.11 , respectively) ($P < 0.05$). Compared with the NaF-exposed rats, the p-CREB protein expression level in cerebral cortex and hippocampus in the NaAsO₂-exposed rats were decreased ($P < 0.05$). The p-CREB protein expression level in hippocampus in the co-exposed rats was statistically lower than that in the NaF-exposed or the NaAsO₂-exposed rats ($P < 0.05$). [Conclusion] Fluoride, arsenic, and co-exposure to both chemicals may down-regulate the expression levels of CREB mRNA and protein phosphorylation in the cerebral cortex and hippocampus of rats.

Key Words: fluoride; arsenic; cAMP response element binding protein; mRNA

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 81102083)

[作者简介] 苏菁(1986—), 女, 硕士生; 研究方向: 神经毒理学;

E-mail: sujing860510@sina.com

[通信作者] 蒋守芳副教授, E-mail: jiangshoufang@163.com

[作者单位] 1. 河北联合大学 a. 公共卫生学院 b. 基础医学院, 河北 063000; 2. 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 063000

氟(F)和砷(As)两种元素在自然界分布广泛。研究表明, 过多的氟、砷可通过血脑屏障进入中枢神经系统造成脑损伤, 并影响神经信号转导通路的功能^[1-3], 从而影响学习记忆能力^[4-6]。国内外流行病学研究表明饮水氟、砷及其联合暴露可引起儿童智力下降, 损害学习记忆能力^[7-8]。迄今, 氟、砷及其联合作用致学习记忆损伤的分子机制尚未阐明。环磷酸腺

昔反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)是一种重要的核转录因子,其调节启动子中具有环磷酸腺苷反应元件的基因转录,是细胞内多种信号通路的一种关键成分,对学习记忆功能具有重要的调节作用。CREB的转录活性依赖于第133位丝氨酸残基(Ser133)的磷酸化(p-CREB),学习记忆的形成依赖于p-CREB通路诱导下游基因的表达。为探讨氟、砷及其联合作用对大鼠学习记忆影响的分子机制,本实验拟对大鼠大脑皮质、海马组织 CREB mRNA 和 CREB 蛋白表达水平进行检测。本文报道该项检测结果。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

Bio-rad 电泳槽、半干式转膜仪(美国 Bio-rad 公司);Rotor-Gene 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪[凯杰企业管理(上海)有限公司];兔抗 CREB、p-CREB、 β -actin(β 肌动蛋白)及抗兔 IgG(辣根过氧化物酶标记,美国 Anbo 生物科技有限公司);超敏 ECL 化学发光试剂(ECL-plus)(美国 PerkinElmer 公司);磷酸化蛋白提取试剂[天德悦(北京)生物科技有限责任公司];CREB 和 β -actin 内参引物、总 RNA 提取试剂盒、c-DNA 合成试剂盒、SYBRGreen 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组与处理 健康、初断乳 SPF(无特定病原体)级 SD 雄性大鼠 32 只,体重 60~70 g[北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0004]。将大鼠按体重随机分为 4 组:对照组、氟处理组、砷处理组和联合染毒组,每组 8 只。4 组大鼠分别自由饮用蒸馏水、120 mg/L 氟化钠水溶液、70 mg/L 亚砷酸钠水溶液和 120 mg/L 氟化钠+70 mg/L 亚砷酸钠混合水溶液,连续染毒 3 个月。染毒期间各组大鼠均自由饮水、正常摄食。

染毒期满,腹腔麻醉,断头处死大鼠,快速分离大脑皮质和海马,一侧大脑皮质和海马用于提取总 RNA,另一侧提取总蛋白。

1.2.2 CREB 基因 mRNA 检测 按照试剂盒说明书提取大脑皮质、海马组织总 RNA,反转录成 c-DNA,实时定量 PCR(RT-PCR)方法测定 mRNA 水平。CREB 基因 mRNA 信号与 β -actin 信号做比较。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计分析。CREB 和 β -actin 的 mRNA 引物序列见表 1。

表 1 CREB 及 β -actin mRNA 引物序列

mRNA	引物序列	引物长度(bp)
CREB	5'-ACAGTTCAAGCCACGCCACAG-3'	94
	5'-GCACCTAAGGTTACAGTGGGAGCAGA-3'	
β -actin	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	115
	5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'	

1.2.3 CREB 和 p-CREB 蛋白表达水平检测 取大鼠大脑皮质、海马组织,按组织重量 1:5 加入裂解液,组织匀浆,冰上裂解 1 h,4℃ 12 000 × g 离心 25 min,取上清。二喹啉甲酸(BCA)法

测定蛋白含量。经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电泳后利用半干式转膜仪将胶上的蛋白转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。转膜后用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1.5 h,分别用 CREB、p-CREB 和 β -actin 抗体(1:1 000)与封闭好的蛋白膜 4℃ 孵育过夜,以 TBST 缓冲液漂洗后,再与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温孵育 1.5 h。将膜与 ECL-plus(超敏化学发光试剂)反应 5 min,胶片曝光,显影、定影。胶片扫描后用 Image J 图像分析软件做灰度分析。蛋白表达量用目的蛋白的灰度值与相应内参蛋白 β -actin 灰度值的相对比值表示。

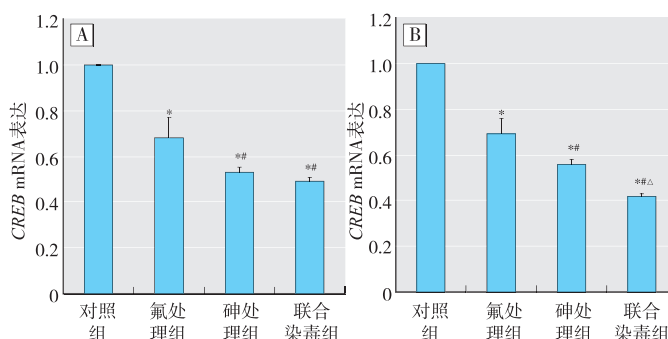
1.3 统计分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,均数间的两两比较采用 Student Newman Keuls(SNK)检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CREB mRNA 表达水平

4 组大鼠大脑皮质、海马组织 CREB mRNA 表达水平见图 1。



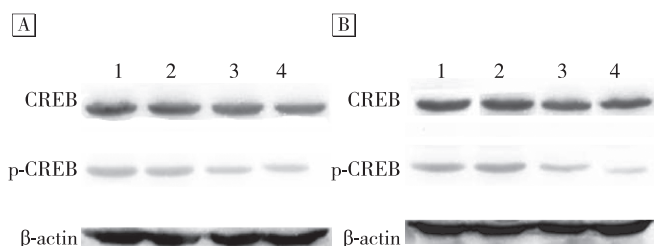
[注]*:与对照组比较, $P<0.05$;#:与氟处理组比较, $P<0.05$;△:与砷处理组比较, $P<0.05$ 。

图 1 大脑皮质(A)、海马(B)组织的 CREB mRNA 表达水平($n=6$)

与对照组相比,氟、砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织的 CREB mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织的 CREB mRNA 表达水平均低于氟处理组($P<0.05$)。联合染毒组大鼠海马组织的 CREB mRNA 表达水平低于砷处理组($P<0.05$)。

2.2 CREB 和 p-CREB 蛋白表达水平

4 组大鼠大脑皮质、海马组织的 CREB 和 p-CREB 蛋白表达 Western blot 条带见图 2。



[注]1:对照组;2:氟处理组;3:砷处理组;4:联合染毒组。

图 2 大脑皮质(A)、海马(B)组织的 CREB 和 p-CREB 蛋白表达

由表 2 可见,与对照组和氟处理组比较,砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质和海马组织 CREB 的蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。与对照组比较,氟、砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织 p-CREB 的表达水平均降低 ($P<0.05$);砷处理组大鼠大脑皮质、海马组织的 p-CREB 蛋白表达水平均低于氟处理组 ($P<0.05$);联合染毒组大鼠海马组织的 p-CREB 蛋白表达水平低于氟、砷处理组 ($P<0.05$)。

组别	大脑皮质		海马	
	CREB	p-CREB	CREB	p-CREB
对照组	0.91 ± 0.53	0.83 ± 0.06	0.77 ± 0.11	0.80 ± 0.11
氟处理组	0.89 ± 0.11	0.68 ± 0.16*	0.70 ± 0.14	0.68 ± 0.15*
砷处理组	0.75 ± 0.09**	0.46 ± 0.13**	0.64 ± 0.08**	0.48 ± 0.11**
联合染毒组	0.66 ± 0.08**	0.38 ± 0.11**	0.52 ± 0.05**	0.31 ± 0.14**△

[注]*:与对照组比较, $P<0.05$; #:与氟处理组比较, $P<0.05$; △:与砷处理组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

本实验通过自由饮用 120 mg/L 氟化钠溶液、70 mg/L 亚砷酸钠溶液及 120 mg/L 氟化钠 + 70 mg/L 亚砷酸钠的混合水溶液,进行亚慢性饮水型氟、砷及其联合染毒。动物实验研究表明,氟、砷暴露可损害大鼠学习记忆能力^[9-10]。CREB 是细胞内多种信号通路的关键因子,在神经元的生长、突触可塑性、学习和记忆功能、损伤和再生等方面起着重要作用^[11]。研究表明,CREB 是长期记忆形成过程所必需的一种关键调节因子^[12],其磷酸化后可通过调节基因转录的活性而在学习记忆密切相关^[13]。有实验结果显示,随染氟剂量的增加,CREB 的蛋白表达量差异无统计学意义,而 p-CREB 的蛋白表达量增高,实验者认为氟中毒可能过度激活大鼠脑组织 Ras-ERK1/2 的信号通路,并通过转录因子 CREB 实现对下游基因的表达调控^[14]。而本实验结果显示,氟、砷处理组和联合染毒组大鼠大脑皮质、海马组织的 CREB mRNA 表达和 p-CREB 的蛋白表达水平均降低,而且砷和氟砷联合暴露使 p-CREB 蛋白表达的降低更甚于氟暴露。可以认为,氟、砷及其联合作用可能影响 CREB 基因和 CREB 蛋白表达,从而干扰 *c-fos*、*c-jun* 基因的表达和新蛋白质的合成而干扰学习记忆功能。结果还显示,氟、砷联合染毒组大鼠海马组织 CREB 基因和 p-CREB 蛋白表达水平明显低于氟、砷单独处理组,提示,氟、砷可能具有一定的协同作用。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] 官志忠.重视地方性氟中毒基础理论研究[J].中国地方病学杂志, 2008, 27(2): 119-120.

[2] ZHANG M, WANG A, HE W, et al. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons[J]. Toxicology, 2007, 236(3): 208-216.

[3] ROGDRIGUEZ VM, CARRIZALES L, JIMÉNEZ-CAPDEVILLE ME, et al. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rats[J]. Brain Res Bull, 2001, 55(2): 301-308.

[4] 王国明,李积胜,周红军,等.不同剂量慢性染氟对大鼠学习记忆行为的影响[J].微量元素与健康研究, 2006, 23(2): 1-2.

[5] 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[J].中国公共卫生, 2006, 22(5): 559-560.

[6] LUO JH, QIU ZQ, SHU WQ, et al. Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats[J]. Toxicol Lett, 2009, 184(2): 121-125.

[7] SAXENA S, SAHAY A, GOEL P. Effect of fluoride exposure on the intelligence of school children in Madhya Pradesh, India[J]. J Neurosci Rural Pract, 2012, 3(2): 144-149.

[8] WASSERMAN GA, LIU X, PARVEZ F, et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Arai-hazar, Bangladesh[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(2): 285-289.

[9] WANG SX, WANG ZH, CHENG XT, et al. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(4): 643-647.

[10] TSAI SY, CHOU HY, THE HW, et al. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence[J]. Neurotoxicology, 2003, 24(4-5): 749-753.

[11] LONZE BE, GINTY DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system[J]. Neuron, 2002, 35(4): 605-623.

[12] KAPLAN MP, ABEL T. Genetic approaches to the study of synaptic plasticity and memory storage[J]. CNS Spectr, 2003, 8(8): 597-610.

[13] WHITE DM, WALKER S, BRENNEMAN DE, et al. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor[J]. Brain Res, 2000, 868(1): 31-38.

[14] 刘艳洁,高勤,官志忠.氟中毒对大鼠脑组织 Ras-Erk1/2 通路及转录因子 CREB 的影响[J].中国地方病防治杂志, 2011, 26(2): 88-92.

(收稿日期: 2013-02-23)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 丁瑾瑜)