

铅对神经系统学习记忆功能的损伤 及药物的修复机制

阮迪云

(中国科学技术大学生命科学学院神经毒理学实验室,安徽合肥 230027)

摘要:概述了中国科学技术大学神经毒理学实验室在铅对神经系统学习记忆功能的损伤及药物的修复机制方面的研究进展,主要包括:①铅对海马突触可塑性的影响;②铅影响离子通道的作用机制;③铅对 NMDA 受体、非 NMDA 受体及其通道特性的损伤;④铅与神经递质的相互作用;⑤铅影响基因对学习记忆的调控;⑥牛磺酸,神经节苷脂,抗氧化剂等药物对铅引起的学习记忆损伤的修复机制。

关键词:铅;学习记忆;突触可塑性;通道和受体;药物;修复机制

中图分类号:Q593+2 **文献标识码:**A

Lead-induced impairment of learning and memory in the nervous system and the mechanisms of pharmacals repair

RUAN Di-yun

(*Neurotoxicology Lab, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*)

Abstract: The advances made in lead-induced impairment of learning and memory in the nervous system and mechanisms of pharmacals repair in Neurotoxicolog Lab in University of Science and Technology of China were described. They include: ① the effect of lead on synaptic plasticity in hippocampus; ② the mechanism of effect of lead on ion channels; ③ lead-induced impairment of NMDA receptor, non NMDA receptors and receptor channels; ④ the interaction between lead and neurotransmitters; ⑤ the effect of lead on gene regulation; ⑥ the repair mechanism of pharmacals (*Taurine, Ganglioside, antioxidants, etc.*) on lead-induced impairment.

Key words: lead; learning and memory; synaptic plasticity; channels and receptors; pharmacals; repair mechanism

收稿日期:2008-06-28; **修回日期:**2008-07-01

基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划(2002CB512907),国家自然科学基金重点项目(39630270,30630057),国家自然科学基金(30170809,3000039,30300288),中国科学院知识创新工程(KZCX2-410,ZCX3-SW-437),教育部博士学科点专项科研基金(1999035811,20020358053)和中国科学技术大学基金(KB0811)资助。

作者简介:阮迪云,教授,现任安徽省神经科学学会理事长。1965年毕业于中国科学技术大学生物物理系,留校工作至今。1985~1989年在美国休斯顿大学从事铅的神经毒理学研究,1993~1994,1998,2000,2004年在加拿大,2006年在意大利从事神经毒理学的合作研究。先后承担国家重点基础研究发展(973)计划子项目,国家自然科学基金重点项目及中国科学院知识创新工程项目等,对铅的损伤与修复机制做了较系统的研究。先后在国际 SCI 杂志上发表学术论文 70 余篇,被聘为“*Toxicology and Applied Pharmacology*”杂志和 Elsevier 出版公司编委,获 2006 年教育部自然科学二等奖。E-mail: Ruandy@ustc.edu.cn

0 引言

铅是环境中一种重要的神经毒,它影响神经系统、消化系统、生殖系统等许多功能,但主要是影响儿童的智力发育和损伤神经系统的学习记忆功能.国内外大量研究表明,婴幼儿和儿童的血铅水平与智商(IQ)值显著相关.当血铅水平为 300~400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, IQ 降低 4~6 分,血铅水平每增加 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,智商平均降低 1~3 分,并伴有认知功能和心理行为的改变^[1~3].随着经济的高速发展,我国部分地区铅污染状况相当严重,儿童铅中毒问题仍然相当普遍.1999 年全国部分地区和城市儿童血铅水平调查,平均 38.8% 的儿童血铅超标.近几年有很大改善,目前仍有 10%~15% 的城市儿童血铅超标,部分工矿企业周边地区更严重,甚至发生多起严重的铅污染事件,影响了社会安定和人们身体健康.

从 20 世纪 80 年代起,我国许多医疗卫生单位和科研工作者对我国铅污染进行了流行病学调查和毒理机制研究,取得了一系列成果.中国科学技术大学生命科学学院神经毒理学实验室经过 20 多年的努力,在铅对儿童智力发育的影响和神经系统学习记忆功能的损伤及药物的修复机制进行了较深入系统的研究,如对 69 名中国科学技术大学少年大学生的研究表明,他们的血铅含量范围为 15~130 $\mu\text{g}/\text{L}$,平均 26 $\mu\text{g}/\text{L}$, IQ(WISC-R 韦氏力量表)值范围为 109~151,证实了他们的血铅低而智商高.应用功能磁共振测试了一些较严重铅中毒儿童(血铅含量高于 300 $\mu\text{g}/\text{L}$)的脑功能和结构的变化,发现脑内海马、前额区神经元结构和功能均受到较严重的损伤.本文主要综述了本实验室近年来在铅对神经系统学习记忆功能的损伤及药物的修复机制方面的研究工作^[4~31].

1 铅作用于神经系统的基本途径

1.1 铅作用于神经细胞的主要通路

铅从细胞外进入细胞内,必须要通过细胞膜,作用于膜上的各类通道和受体;在细胞内,铅通过影响胞内信号转导通路、第二信使等来影响细胞功能;在细胞核,铅损伤 DNA、RNA 及其修复功能.铅作用的基本通路如图 1 所示.

1.2 铅影响学习记忆功能的主要机理

学习记忆本身是一个非常复杂的过程,其细胞和分子机制目前仍然很不清楚,但基本框架是清楚

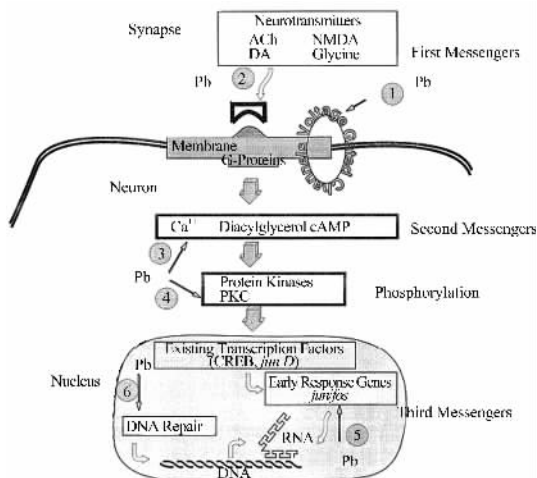


图 1 铅作用于神经细胞的基本通路(引自文献[32])

Fig. 1 The possible pathway of action of lead in neurons (from Ref. [32])

的;即海马是脑内学习记忆的关键部位;突触可塑性(长时程突触后增强(long-term potentiation, LTP)和长时程突触后减弱(long-term depression, LTD))是学习记忆形成过程中的可能机制;受体和通道是产生 LTP 和 LTD 的生物学基础;神经递质、即早基因和转录因子 CREB(cAMP 反应成分结合蛋白)等参与学习记忆过程,整个学习记忆过程受基因调控.

铅影响学习记忆的细胞和分子机制可用下列要点表示:

- 海马是脑内学习记忆关键部位
- ↓ 突触可塑性是学习记忆的重要机制
- 铅影响海马神经元突触可塑性
- ↓ 受体和通道是产生 LTP/LTD 的基础
- 铅影响 NMDA 等受体通道特性
- ↓ NMDA 受体与 LTP/LTD 产生和维持有关
- 铅影响 NMDA 受体亚单位基因表达
- ↓ Ca^{2+} , PKC, NO 等是产生和维持 LTP/LTD 所必需
- 铅影响钙通道和蛋白激酶 C(PKC)及 NO 等
- ↓ 神经递质参与学习记忆过程
- 铅影响神经递质和神经调质的变化
- ↓ 蛋白磷酸化在长期记忆中起关键作用
- 铅影响 cAMP 和 CREB 等因子
- ↓ 学习记忆受基因调控
- 铅损伤 DNA、RNA,影响基因表达和修复

2 铅作用机理

2.1 铅对海马突触可塑性的影响

突触可塑性是学习记忆的神经生物学基础,突

触可塑性的强弱一定程度上反映学习记忆能力的大小. 海马是学习记忆的关键部位. 海马内有 3 个主要的兴奋性突触连接, 即 SC-CA1(雪氏侧支-CA1 锥体细胞), MF-CA3(苔状纤维-CA3 锥体细胞), PP-DG(穿通纤维-齿状回). 我们实验室比较详细地研究了铅对海马 3 个区域突触可塑性的影响.

(I) 铅对海马 LTP 的影响. 用在位记录方法研究了发育过程中低铅暴露对大鼠海马齿状回 LTP 的影响和锌的拮抗作用. 结果表明, 铅使得海马齿状回 EPSP(兴奋性突触后电位)和群峰电位(PS)诱导的 LTP 的幅度都降低, 并且 PS 诱导的 LTP 受损伤更严重, 而锌对铅引起的 LTP 的损伤有明显的保护作用. 对于 PS 诱导的 LTP 幅度, 对照组增加 221%, 铅处理组增加 73%, 而锌加铅处理组增加 164%; EPSP 诱导的 LTP 幅度, 对照组增加 73%, 铅处理组增加 39%, 而锌加铅处理组增加 48%. 我们还研究了铅对海马齿状回双脉冲易化反应的影响和锌的拮抗作用. 结果表明, 对照组双脉冲易化反应幅度增加 113%, 铅处理组只增加 57%, 而锌和铅处理组增加了 91%. 显然, 铅损伤齿状回的双脉冲反应, 而锌有一定的保护作用^[4].

应用离体脑片记录技术研究了铅对海马 CA1 和 CA3 区 LTP 的影响和 NO 在 LTP 产生和维持中的作用. 结果表明, CA1 区在对照组 EPSP 诱导的 LTP 的幅度增加了 87%, 而铅处理组只增加 29%; 在 CA3 区对照组 EPSP 诱导的 LTP 的幅度只增加 26%, 但铅处理组却增加了 97%. 显然, 铅使 CA1 的 LTP 幅度降低, 而使 CA3 的 LTP 幅度增高. 铅对 CA1 和 CA3 的 LTP 影响的差异是由于 CA1 和 CA3 产生 LTP 的机理不同^[5]. CA1 区 LTP 的产生主要通过 NMDA 受体的作用, 而 CA3 区 LTP 的产生机制是非 NMDA 受体依赖性的. 铅影响 CA1 区 LTP 的幅度主要是通过影响 NMDA 受体, 抑制了其通道电流的结果. 而铅使得 CA3 区幅度增高可能是铅降低了突触 GABA 的释放, 铅通过降低 GABA 介导的抑制作用来增加 CA3 锥体细胞的兴奋性^[5]. 我们的实验还证实了 NO 在 CA1 区诱导和维持 LTP 的过程中起着逆行信使的作用. 我们研究了铅对去氧葡萄糖(2-DG)诱导的 LTP 的影响, 发现铅使 2-DG 诱导的 LTP 的幅度增加, 但铅使高频刺激诱导的 LTP 的幅度减少.

(II) 铅对海马 LTD 的影响. 根据在海马诱导的 LTD 能否被 NMDA 受体阻断剂所阻断而将其

分为 NMDA 受体依赖性 LTD(如 CA1 区 LTD)和非 NMDA 受体依赖性 LTD(如 CA3 区 LTD). 实验证明, LTD 的产生主要依赖于突触后 Ca^{2+} 内流和谷氨酸受体敏感性的长时程降低. 而低频刺激使突触后只有少量 Ca^{2+} 内流, 少量 Ca^{2+} 内流可选择性激活磷酸酯合成酶, 导致 NMDA 受体失敏而产生 LTD, 而非 NMDA 受体依赖性的 LTD 的诱导是由于突触前 Ca^{2+} 的升高和突触前代谢型谷氨酸受体(mGluRs)的激活.

我们应用在位和离体电生理技术研究了铅对海马 CA1 区和 DG 区 LTD 的影响. 结果表明, 铅损伤了 CA1 区和 DG 区 LTD 的诱导, 使 CA1 区 LTD 的幅度降低. 对照组 LTD 的平均幅度为 $(61.0 \pm 11.0)\%$ ($n=15$), 而铅处理组为 $(78.0 \pm 8.0)\%$ ($n=8$), 也就是说, 低频刺激后对照组 LTD 幅度可减弱 39%, 而铅处理组只减弱了 22%, 两者差异存在统计学意义 ($P < 0.01$). 在 DG 区, 低频刺激后, 对照组 LTD 幅度为 $(72.0 \pm 22.0)\%$ ($n=8$), 即减弱了 28%, 而铅处理组几乎没有 LTD 产生. 也就是说, 铅完全损伤了 DG 区神经元突触后长时程压抑效应^[6].

我们还研究了铅对发育不同时期(仔鼠出生后 17~23、27~33、57~63 d)海马 CA1 区和 DG 区 LTD 的影响. 结果表明, 在 CA1 区, 对照组和铅处理组都是随年龄增加 LTD 幅度减小; 但在 DG 区, 对照组随年龄增加 LTD 幅度反而增加, 而铅处理组随着年龄增加 LTD 幅度减小. 说明 LTD 在 CA1 和 DG 区(齿状回)发育过程中产生机制不同, 铅作用于 2 个区域的位点也不同^[7].

(III) 铅对海马突触可塑性范围的影响. 突触可塑性包括增强和减弱 2 个方向的调节, 即 LTP 和 LTD. 我们提出了突触可塑性范围的新概念, 用它来表征突触可塑性能力的大小, 在一定程度上表明学习记忆能力的大小, 并定义为 LTP 和 LTD 幅度的总和. 笔者在大鼠海马 CA1 区的研究表明, 铅使 LTP 和 LTD 的幅度都降低, 从而使突触可塑性范围变窄. 对照组的突触可塑性范围为 129%, 而铅处理组则减小到 44%^[6].

(IV) 铅对突触形成的影响. 学习记忆过程将产生突触联系强度的变化, 这种变化的基础又有赖于发育过程中突触联系的形成. 在对海马神经元铅暴露的培养过程中, 发现铅抑制了海马神经元轴突的发生而增加了树突的数目, 但能增加轴突的长度和

分枝,在 NGF(神经生长因子)诱导的 PC 12 细胞系突触形成中,低铅暴露可使突起延伸变长及数目增多,铅使突起形态变大而扁平.铅还可以通过钙信号转导系统来调控突起的发生.

2.2 铅对离子通道的影响

(I) 铅对海马神经元 Ca^{2+} 通道的影响.铅作用于电压依赖性 Ca^{2+} 通道,阻断 Ca^{2+} 电流, Ca^{2+} 电流减少的量与 Pb^{2+} 的浓度有依赖关系.在钙通道中, Pb^{2+} 与 Ca^{2+} 有一个高度特异性的竞争位点, Pb^{2+} 是 Ca^{2+} 的一个特异的竞争性拮抗剂.铅可以通过与 Ca^{2+} 竞争进入细胞内, Pb^{2+} 的吸收可被 Ca^{2+} 通道阻断剂 D-600 所阻断,又能被 Ca^{2+} 通道激动剂 Bay K8644 所增强.铅还作用于线粒体内,破坏内质网上的第二信使 IP₃(三磷酸肌醇),使细胞内自由 Ca^{2+} 浓度升高,胞内 Ca^{2+} 超载是引起神经细胞损伤和死亡的重要原因.

我们研究了 NMDA 受体依赖性的和电压依赖性的 Ca^{2+} 通道 2 种成分在海马神经元诱导 LTD 中的贡献,以及铅对该 2 种成分的损伤.发现在海马 CA1 区铅对 2 种成分损伤相似,但在 DG 区,电压依赖性的 Ca^{2+} 通道损伤更为严重^[8].

Pb^{2+} 可以取代 Ca^{2+} 激活 PKC.铅取代钙后可扰乱对 PKC 的正常激活,导致 PKC 反应敏感性下降,扰乱 PKC 在学习记忆中的正常功能.

铅还作用于钙调素-蛋白激酶和 cAMP-蛋白激酶等.NMDA 受体通道内 Ca^{2+} 内流而激活钙调素和钙/钙调素激酶等从而产生逆行信使 NO,这是 LTP 产生和维持的主要过程. Pb^{2+} 可以取代这一反应中的 Ca^{2+} 而发挥作用,甚至在没有 Ca^{2+} 的情况下, Pb^{2+} 也可以作用于钙调素.铅较钙更容易与钙调素结合, Pb^{2+} 至少可以替代 Ca^{2+} 的两种与钙调素有关的过程,即激活钙调素依赖性脱磷酸酶和开放红细胞膜上的 K^{+} 通道^[35].还有一种可被 cAMP 激活的蛋白激酶可引起突触蛋白的磷酸化,而铅可以通过抑制腺苷酸环化酶间接抑制蛋白磷酸化过程,从而影响学习记忆.

(II) 铅对海马神经元 K^{+} 通道的影响.我们研究了铅对海马 CA1 区瞬态外向 K^{+} 通道电流(I_A)激活、失活和稳态特性的影响,结果发现铅抑制了 K^{+} 通道电流,使 I_A 电流激活电压升高,失活时间常数延长,损伤了 K^{+} 通道的稳定特性.笔者还研究了铅对大鼠背根神经节瞬时外向 K^{+} 通道电流的影响,发现铅是一种剂量和电压依赖性的阻断剂,可逆的

阻断背根神经节外向 K^{+} 通道电流,使 I_A 激活电压升高,失活时间常数延长^[9].

(III) 铅对海马神经元 H 电流的影响.我们研究了铅对海马 CA1 区内向超极化电流(I_H)的影响,结果发现,铅抑制了 I_H 电流的大小,使得 I_H 从超极化方向往去极化方向移动,降低了 I_H 电流的激活电压,延长了激活时间常数.

2.3 铅对 NMDA 受体、非 NMDA 受体及其通道特性的影响

(I) 铅对 NMDA 受体及其通道特性的影响.铅作用的主要位点之一是 NMDA 受体^[34].现已清楚,NMDA 受体包括 NR1 和 NR2 A-D、NRL 等多种亚单位.NR1 的 DNA 分子序列已经克隆,总长度 4 213 bp,938 个氨基酸,相对分子质量 105 500,包含 4 个跨膜片断 TM1、TM2、TM3、TM4^[35].NR2 有 4 个亚单位 NR2A-D,而且 NR2 的亚单位分别在海马发育的不同时期表达,如 NR2B、NR2D 在出生前,而 NR2A、NR2C 则在出生后表达^[11].

应用原位杂交技术研究了发育早期低铅暴露对出生后不同时期仔鼠海马神经元 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D 和 NRL mRNA 表达的影响,结果发现在仔鼠出生后 4~17 d 发育关键期内,铅对 NR1、NR2A、NR2B、NRL 等亚单位的损伤较大,这一结果比国际同行的报道更加详细^[11].在技术上,笔者用地高辛标记 cRNA 探针,原位杂交监测了大鼠海马 NMDA-L mRNA,为研究铅影响 NMDA 受体亚单位基因表达的影响探索了一种新的方法.

NMDA 受体和通道有许多作用位点,如谷氨酸、甘氨酸、电压依赖性 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 、通道阻断剂(如 Mg^{2+} 、N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂如 MK-801、PCP、APV)、多胺等作用位点.铅作用于 NMDA 受体及其通道内的任何一个位点都会影响学习记忆.

铅选择性地抑制 NMDA 受体通道电流,是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂.铅既能破坏受体也能激活受体通道.它使 NMDA 激活的受体通道开放的次数减少,而且恢复得很慢^[36].根据这些实验结果,Alkondon 等^[34]推测 Pb^{2+} 既不作用于 NMDA 受体或通道的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的作用位点,也不是与谷氨酸、甘氨酸的结合位点相互作用.由于 MK-801(dizocilpine)是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂,而且 Zn^{2+} 又是对 MK-801 的结合有很强阻断作用的

二价阳离子,因此 Alkonton 等推测 Pb^{2+} 是作用于 NMDA 受体的 Zn^{2+} 结合位点上. Vjihara 等^[37] 提出 Pb^{2+} 对 NMDA 受体的影响是发生在膜电场的表面. 与 Zn^{2+} 不一样, Pb^{2+} 是一个非竞争性谷氨酸和甘氨酸结合位点的拮抗剂. Vteshev 等^[38] 认为铅暴露减少了大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元中 NMDA 受体通道中天门冬氨酸和甘氨酸的活性. Pb^{2+} 是通过与 Glu/Gly 受体结合位点的相互作用来调控 NMDA 通道的活性,其结果是导致通道电流的减少,这种作用是不可逆的. 但 Guilarte 和 Miceli^[39] 进一步证实,对于 MK-801 与 NMDA 受体通道的结合来说, Pb^{2+} 要比 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 有更强的抑制作用,而且这种影响有年龄依赖性,只有在新生大鼠海马神经元 NMDA 受体中 Pb^{2+} 才表现出对 MK-801 结合的强抑制效应.

(II) 铅对非 NMDA 受体的影响. 我们研究了铅对 AMPA/Kainate 受体的影响,结果发现铅损伤了海马 CA1 区、CA3 区和 DG 区的 AMPA 受体,以及损伤了 CA1 和 DG 区的 Kainate 受体^[10],还应用脑片膜片钳、激光共聚焦、海马脑片电生理技术及免疫印迹杂交等方法技术较深入地研究了铅对海马神经细胞内质网上 Ryanodine 受体的影响^[23].

2.4 铅对神经递质的影响

多巴胺、胆碱类、氨基酸和神经肽等神经递质都参与了学习记忆过程. 铅对学习记忆的损伤必然会引起神经递质的变化. 在神经系统静息状态时,铅可以通过 PKC 的作用提高突触前神经递质的自发释放,但在活动状态下, Pb^{2+} 通过抑制电压依赖性 Ca^{2+} 通道的作用而使神经递质的释放减少.

(I) 多巴胺及其 D1 和 D2 受体对学习记忆的功能很重要. 损害多巴胺能系统将会造成学习记忆功能的损伤,如帕金森综合征就是与纹状体的多巴胺能系统的损伤有关. 铅影响突触前多巴胺的合成和释放,如血铅为 320~360 $\mu\text{g/L}$ 时,在伏隔核和尾状核中由 γ -丁氨酸内酯合成多巴胺的能力降低,二羟基苯乙酸(DOPAC)和高香草酸(HVA)水平降低. 同时还证实了铅使突触小泡中多巴胺贮存量的减少和释放量的降低,在发育过程中铅暴露将产生多巴胺重吸收的减少^[40].

(II) 胆碱类递质参与了学习记忆过程. Alzheimer 综合征和痴呆症都与皮层和海马中胆碱能系统功能丧失有关. 在体和离体实验都证实了铅导致 Ach 释放的减少和胆碱能功能降低. 哺乳期铅

暴露使大鼠的皮层、海马、中脑和纹状体中 Ach 的回收率减少 35%~54%,血铅水平为 200 $\mu\text{g/L}$ 的大鼠海马中胆碱乙酰化酶的活性下降 30%~40%^[41]. 宫内铅暴露使大鼠海马胆碱乙酰基转移酶(ChAT)活性降低,高铅和低铅 21 d 鼠龄组 ChAT 活性分别降低 39%和 25%,35 d 鼠龄组分别降低 32%和 23%. 铅暴露使 2 种毒蕈碱受体中的 1 种(M2)超敏感. M2 毒蕈碱受体是海马、皮层和纹状体中突触前胆碱能受体的主要亚型, M2 的激活会降低乙酰胆碱的释放. 铅能引起 M2 受体激动剂的超敏感性从而激活 M2,最终使 Ach 释放量减少^[42]. 我们研究了铅对胆碱能受体不同亚单位 M1-M5 的作用机制的差异.

我们研究了尼古丁对慢性铅暴露 NMDA 受体介导的突触可塑性损伤的修复作用及可能机制,发现尼古丁可易化铅暴露鼠海马 CA1 区 LTP 的诱导和表达,并可被烟碱样胆碱受体拮抗剂美加明 Mecamylamine(MEC)所阻断,多种 nAChRs 受体亚型参与了该修复作用^[22].

(III) 学习过程中脑内氨基酸水平发生了变化. 铅暴露减少了大鼠纹状体脑脊液中兴奋性氨基酸(谷氨酸、天门冬氨酸等)的水平,但增加了 K^+ 诱发的抑制性氨基酸(甘氨酸、牛磺氨酸等)的释放. 血铅水平 130 $\mu\text{g/L}$ 的豚鼠的谷氨酰胺合成酶活性下降 30%~40%,铅可以作为甘氨酸的一种非竞争性拮抗剂^[43]. 我们完成了铅引起的学习记忆过程中脑内氨基酸水平变化的研究. 对对照组和铅处理组大白鼠进行操作式学习记忆训练,用微透析探针技术在动物训练前和训练后提取脑内海马区域内脑脊液样品,分析其氨基酸水平的变化. 结果表明,铅处理组比对照组学会所需天数大大增加,学习记忆能力大大降低,脑内海马区域的各种氨基酸水平都发生了显著变化,尤其是谷氨酸、甘氨酸等^[21].

2.5 铅对基因调控的影响

在学习记忆和 LTP 的产生过程中都有即早基因 c-fos, c-jun 等的表达. Tischmeyer 等^[44] 在训练大白鼠完成“Y 迷宫”学习后,发现海马 c-fos mRNA 的表达升高,提示诱导海马 c-fos mRNA 的表达是形成长期记忆的必要条件. 以后进一步证实只有海马产生长时程的 LTP 并伴有新蛋白合成时才有 c-fos 表达,而短时程的 STP 没有 c-fos 表达.

cAMP 可诱导产生长时程的 LTP,在介导产生有新蛋白合成的长期记忆中起关键作用. 在 cAMP

传输通路上被递质激活的腺苷酸环化酶产生细胞内的 cAMP, 然后 cAMP 与蛋白激酶 A(PKA) 的调控亚基结合而释放能转移到细胞核的催化亚基, 同时使它与 CREB(cAMP 反应成分结合蛋白) 磷酸化. PKA 在位点 Ser-133 上使 CREB 磷酸化, 并促使 CREB 与 CREB-结合蛋白结合, 可易化基本的转录机理, 从而激活被 CREB-调控的基因. 因此 cAMP 和转录因子 CREB 在长期记忆中起关键性作用^[42].

铅对即早基因和 CREB 的影响已有不少研究. 铅可以作用于即早基因 *c-fos* 和 *c-jun*, 引起 mRNA 表达的提高. 铅可以通过干扰生化通路或第二信使系统改变细胞核以外的基因表达过程. 同时, 铅也可以改变特异性地依赖于金属离子的转录因子的含量, 如锌-指蛋白. 铅可以抑制 DNA 的修复作用, 在 DNA 修复过程中, 铅发挥了聚合、结扎等干扰作用, 从而抑制 DNA 的修复作用. 铅还可以通过抑制腺苷酸环化酶来间接影响 cAMP 与 PKA 调控亚基的结合, 从而影响 CREB 的磷酸化作用, 损伤长期记忆.

3 药物对铅引起学习记忆功能损伤的修复作用

3.1 牛磺酸对铅引起的神经系统损伤的修复机制

笔者应用在体和离体记录方法及膜片钳技术详细地研究了牛磺酸对铅引起的海马神经元突触可塑性(LTP、LTD)和离子通道损伤的修复作用. 牛磺酸是可兴奋组织中细胞内含量最丰富的自由氨基酸, 具有抑制性递质的作用, 调节激素释放, 调节细胞内外渗透压平衡, 调节细胞钙稳态, 预防钙超载, 刺激糖分解、糖原合成, 降低血胆固醇, 调节磷脂代谢, 促进细胞增殖、分化, 稳定细胞膜清除自由基和抗脂质过氧化, 促进神经系统生长发育、增殖分化, 增强学习记忆、延缓衰老等作用. 牛磺酸对维持中枢神经、心血管系统、视觉系统、血液、免疫和生殖系统的正常功能均有重要意义.

牛磺酸对细胞内钙离子有双向调节作用, 即牛磺酸能使神经细胞内钙离子浓度轻度升高, 又能使处于高钙状态的细胞内 Ca^{2+} 浓度下降, 牛磺酸可能是通过对钙稳态的调节来阻止细胞内钙超载, 保护神经细胞, 并发挥其增强动物学习记忆等方面功能的.

在正常动物体内, 牛磺酸并不起作用, 只有当机体受到损伤时它才发挥其保护作用. 我们的研究证

明了: ①牛磺酸抑制了铅在海马脑区的沉积, 铅改变血管壁细胞膜的通透性, 而牛磺酸对内皮细胞的存活有益, 并能维持细胞膜的通透性, 因此保护了血脑屏障, 减少了通过屏障而进入大脑的铅量; ②牛磺酸对细胞内钙稳态起调节作用, 对胞内钙库和细胞膜上的钙通道都有直接或间接的影响, 而铅毒性作用的重要方式是破坏了钙稳态, 抑制了钙信号的传递, 因而, 牛磺酸的外源增强可能拮抗了铅的影响; ③牛磺酸急性实验提示了它可能是突触可塑性改变过程中的中间信使之一, 并且牛磺酸可直接调控 NMDA 受体活性. 总之, 牛磺酸是通过维持细胞膜的通透性, 提高内皮细胞的活力, 加强血脑屏障的功能, 减少铅的进入, 增加铅的排出等机制来修复铅引起的神经系统的损伤^[18, 19, 27].

3.2 神经节苷脂对铅引起的学习记忆功能损伤的修复作用

神经节苷脂(*Gangliosides*, Gls)是含有唾液酸的酸性鞘糖脂, 它由亲水的寡糖链和亲水的神经酰胺两部分组成. 主要包括含单唾液酸 GM(GM1, GM2, GM3)、含二唾液酸 GD(GD1a, GD2, GD3)、含三唾液酸 GT(GT1a, GT1b)和含四唾液酸(GQ1b)等. Gls 是哺乳动物细胞膜的重要组成部分. 神经节苷脂在中枢神经系统特别是脑细胞中含量丰富. 外源性的 Gls 可通过血脑屏障, 并嵌入到神经元细胞膜中发挥作用, 调整细胞对各种刺激所做出的反应. 神经节苷脂的临床试验表明其无明显的不良反应, 可用于防治缺血缺氧性脑损伤、阿尔茨海默症(AD)、帕金森病(PD)及肌萎缩侧索硬化、糖尿病和酒精性神经病等中枢神经系统和外周神经系统的疾病. 神经节苷脂的神经生物学作用主要有: ① GM1 为兴奋性氨基酸(EAA)受体的过度激活的拮抗剂, 对抗 EAA 神经毒性作用; ② Gls 能改善钙平衡紊乱及氧自由基代谢异常. GM1 能增加体内对抗自由基的物质含量, 增加对氧自由基的清除能力, 降低自由基含量, 并能抑制 NMDA 受体过度激活而引起的持续地 Ca^{2+} 内流, 恢复胞内的 Ca^{2+} 平衡; ③ 保护细胞膜的结构和功能. 膜 Na^+-K^+ ATP 酶对保持膜稳定和兴奋性起着重要的作用. 中枢神经系统的损害以膜损害为开始, 并与 Na^+-K^+ ATP 酶的活性缺失有关. GM1 能保护或恢复 Na^+-K^+ ATP 酶活性, 减少神经元和神经胶质细胞膜功能的障碍^[46]; ④ GM1 和 GQ1 通过调节神经营养因子(主要是神经生长因子等)机制促进体外培养神经细胞

突起的萌发、延伸,并有可能促进突触形成^[4],GQ1a促进受损神经元的再生和机能恢复。

我们采用在位电生理技术研究了神经节苷脂在慢性铅暴露所引起的大鼠海马 DG 区突触可塑性损伤中的作用,发现腹腔注射神经节苷脂能修复铅所引起的突触可塑性损伤,增大 LTP 的幅度,降低海马脑片颗粒细胞诱导 LTP 的阈值;可能机制是神经节苷脂增加膜的流动性,形成 Ca^{2+} -GIs 的复合体,调节多种膜的功能蛋白,离子泵和受体,修复铅引起的 NMDA 受体损伤等^[25]。

3.3 抗氧化剂对铅引起的损伤的修复作用

(I) 铅引起氧化损伤的毒理机制:①铅能诱导活性氧产生:铅通过干扰卟啉类物质的代谢,影响血红蛋白的合成(甚至使合成途径发生障碍)而诱导活性氧的产生;微量的铅既可抑制含硫基的 δ -氨基- γ -酮戊酸脱水酶(δ -ALAD)和血红素合成酶(HS),也可抑制 δ -氨基- γ 酮戊酸合成酶(δ -ALAS)等,从而影响血红素的合成。由于负反馈作用,血红素的合成受阻会刺激 δ -ALAD 活性,增加 δ -氨基丙酸的合成,造成 δ -氨基丙酸在血液和尿中积累。在 pH 7.0~8.0 条件下, δ -氨基丙酸可发生烯醇化,形成烯醇式 δ -氨基丙酸,后者能和氧合血红蛋白偶联产生超氧自由基、过氧化氢和羟自由基。其基本过程是,烯醇式 δ -氨基丙酸将电子供给分子氧,产生超氧自由基和过氧化氢,自己也成为自由基, δ -氨基丙酸自由基和氧合血红蛋白偶联又进一步产生活性更强的羟自由基。除氧合血红蛋白外,高铁血红蛋白和其他含铁蛋白也可激发烯醇式 δ -氨基丙酸产生自由基。烯醇式 δ -氨基丙酸自由基还会进一步破坏 DNA,足见其危害。另外,血红蛋白代谢受阻可以造成血液中锌原卟啉的增加,该物质既可导致其他分子的损伤,更能通过光敏反应把分子氧激发为超氧阴离子自由基,直接诱发脂质过氧化,产生更多自由基,危害可想而知。②铅影响细胞膜的保护作用:除了直接诱导活性氧产生外,促氧物质也能依靠增加细胞膜的敏感性来间接诱导活性氧产生。大量研究主要集中在铅对膜成分的可能毒性作用,并努力寻找铅对膜成分的影响与铅诱导的氧化损伤之间的联系;有关铅对细胞的毒害在红细胞中研究较多,因为血液接触铅的机会最多,红细胞对铅的亲合力最强。研究发现,铅处理后,细胞膜变脆,透性增加,结合于膜上的酶和蛋白质组成发生改变,膜脂质的过氧化水平增加(丙二醛 MDA 含量升高);研究发现,经铅处理的

红细胞膜脂疏水区的流动性增大,膜蛋白的构象也发生变化,如果膜蛋白的三级结构深层的巯基结合位点增多,将对红细胞膜骨架蛋白产生较大影响。铅不但直接引起膜的过氧化,而且使膜更易遭受自由基攻击。铅除促进膜脂过氧化外,还影响膜脂质的组成,研究发现铅对磷脂酰胆碱具有强烈的束缚作用,铅中毒后的红细胞膜磷脂酰胆碱水平大大下降;铅在体外能与磷脂双分子膜紧密结合,体内实验也证明,脂质过氧化水平的增加和磷脂水平的下降与脑区的铅浓度显著相关,因此,转变的膜脂质成分可导致细胞膜完整性、渗透能力的变化从而增加细胞对脂质过氧化的敏感性。这些结果似乎提示,铅改变了膜的脂质组成,从而影响了膜的完整性,使膜更易被自由基攻击。③铅影响细胞抗氧化系统正常功能。大量研究证实,在接触铅的动物和工人身上发现,铅中毒会降低细胞中一些抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、含硒甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等的活性和细胞内抗氧化剂含量。对某些酶,铅主要通过和酶蛋白中的巯基(这些巯基有时就是其活性中心)结合而抑制酶活性,如谷胱甘肽还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;铅对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(该酶含许多巯基)有极强的抑制作用,该酶催化葡萄糖-6-磷酸产生 NADPH,后者为氧化型谷胱甘肽转化成还原型谷胱甘肽所必需,故它在细胞的抗氧化中起着重要作用。铅除了与酶中巯基结合降低酶活性外,还作为非竞争性抑制剂,影响酶与葡萄糖-6-磷酸和还原型辅酶 1(NADPP)结合;而对另一些酶,如 SOD、CAT、GSH-Px,则是通过影响酶中的微量元素有效性发生作用的。硒是 GSH-Px 的必需成分,铁和铜、锌、锰分别是 SOD 和 CAT 的辅基,铅都影响它们的吸收。细胞中受铅影响最大的抗氧化物是还原型谷胱甘肽。铅除通过抑制葡萄糖-6-磷酸脱氢酶阻止其再生外,还可直接与其所含的半胱氨酸的巯基结合,干扰它发挥抗氧化活性。总之,铅对抗氧化酶活性的抑制作用将损伤细胞的抗氧化体系,增加细胞对氧化损伤的敏感性。

(II) 硫辛酸对铅引起的氧化损伤的修复作用。硫辛酸(LA)作为一种天然强抗氧化剂,其抗氧化功能主要表现在如下几个方面:①清除自由基和活性氧;硫辛酸可清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1\text{O}_2$)、一氧化氮自由基($\text{NO}\cdot$)、过氧化亚硝基($\cdot\text{OONO}$)和次氯酸(HClO),虽然硫辛酸不能清除过氧化物自由基($\text{ROO}\cdot$)和超氧

阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),但是硫辛酸的还原态二氢硫辛酸(DHLA)能清除单线态氧以外的其他自由基,因此,硫辛酸和 DHLA 在生物体内的相互转化和代谢再生过程中,能清除上述所有自由基.例如, H_2O_2 和淀粉肽能刺激自由基的形成,从而引起神经细胞凋亡,并导致 Alzheimer 病(AD).硫辛酸能透过血脑屏障,降低 H_2O_2 和淀粉肽的细胞毒性,抑制并清除自由基,是治疗 AD 的一种较理想的药物^[4].

②螯合金属离子:生物体内铁、铜、汞、镉等过渡金属离子能催化过氧化氢分解产生强毒性的羟基自由基,导致组织损伤.硫辛酸和 DHLA 能够螯合这些金属离子,从而抑制自由基的形成.硫辛酸对砷、镉离子的螯合特别有效.当硫辛酸与砷的摩尔比为 8:1 时,可完全防止小鼠和狗的砷中毒.硫辛酸与一种琥珀酸衍生物联合给药可预防铅中毒. Wilson 病患者铜代谢紊乱,导致肝中铜积累过多.硫辛酸能螯合铜离子,使铜经尿液排出,肝功能恢复正常,从而减轻 Wilson 病神经及精神紊乱综合征.

③与其他抗氧化剂的相互作用: DHLA 是一种强还原剂,可还原再生许多氧化型抗氧化剂如抗坏血酸、维生素 E、谷胱甘肽(GSH)、辅酶 Q、硫氧还蛋白等.硫辛酸和 DHLA 的氧化还原激活了生物体内其他抗氧化剂的代谢循环,形成独特的生物抗氧化剂再生循环网络,维持机体正常的抗氧化剂水平,共同发挥生物抗氧化作用.

④硫辛酸对铅引起氧化损伤的修复作用:有人用 2 000 mg/kg 的醋酸铅饲喂 F334 鼠 5 周,而后再每天用 25 mg/kg 的硫辛酸饲喂,1 周后脑、红细胞和肾中丙二醛消失,而过氧化物酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶恢复到正常水平^[6]; Gurer 等^[47]利用 CHO 细胞和 Fischer344 大鼠进行研究,发现硫辛酸(LA)处理能显著增加 Fischer344 大鼠和 CHO 细胞的 GSH 水平,降低丙二醛(MDA)含量,显示较强的抗氧化作用.我们的研究表明,各剂量硫辛酸均有修复铅引起的海马 CA1 区 LTP 损伤的作用,并能降低血浆、海马和全脑中 MDA 的含量,提高血浆、海马和全脑 GSH 和总 SOD 活力,表明硫辛酸能够修复铅引起的氧化损伤,并且与剂量有关.当剂量为 25 mg/kg 时其修复作用最强,但高于 25 mg 时,其修复作用反而有下降的趋势;提示硫辛酸可做为一种良好的铅中毒的辅助治疗剂.

(Ⅲ)茶多酚对铅引起氧化损伤的修复作用.我们的研究表明,不同剂量的茶多酚均有修复铅引起的海马 CA1 区 LTP 损伤的作用,并能降低血浆、海

马和全脑中 MDA 含量,提高血浆、海马和全脑 GSH 和总 SOD 活力,表明茶多酚能够修复铅引起的氧化损伤,并且与剂量有关.

4 展望

铅污染问题已成为各国尤其是发展中国家普遍存在的问题.我国儿童铅中毒问题仍然相当严重.一个重要的特点是发育早期严重铅中毒所造成的脑功能损伤是不可逆的,而现在临床上使用的螯合剂只能降低体内的铅含量,不能有效的修复铅引起的脑功能的损伤.因此,加强铅中毒的预防,进一步研究铅的作用机理,寻找有效修复铅引起的脑功能损伤的药物是今后需要解决的重要课题.

致谢 本实验室完成的各项研究成果,是所有参加本实验室工作的教员,博士后,博士生,硕士生和本科生的贡献,在此一并向他们表示感谢.

参考文献(References)

- [1] Pocock S J, Smith M, Baghurst P. Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence[J]. *BMJ*, 1994, 309: 1 189-1 197.
- [2] Shen X M, Rosen J F, Guo D, et al. Childhood lead poisoning in China[J]. *Sci Total Environ*, 1996, 181: 101-109.
- [3] Altmann L, Weinsberg F, Sveinsson K, et al. Impairment of long-term potentiation and learning following chronic lead exposure[J]. *Toxicol Lett*, 1993, 66: 105-112.
- [4] Ruan D Y, Chen J T, Zhao C, et al. Impairment of long-term potentiation and paired-pulse facilitation in rat hippocampal dentate gyrus following developmental lead exposure in vivo[J]. *Brain Res*, 1998, 806: 196-201.
- [5] Xu Y Z, Ruan D Y, Wu Y, et al. Nitric oxide affects LTP in area CA1 and CA3 of hippocampus in low-level lead-exposed rat[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1998, 20: 69-73.
- [6] Zhao W F, Ruan D Y, Xu Y Z, et al. The effects of chronic lead exposure on long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus in vitro[J]. *Brain Res*, 1999, 818: 153-159.
- [7] Sui L, Ge S Y, Ruan D Y, et al. Age-related impairment of long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus following developmental lead exposure in vitro[J]. *Neurotoxicol*

- Teratol, 2000, 22: 381-387.
- [8] Sui L, Ruan D Y, Ge S Y, et al. Two components of long-term depression are impaired by chronic lead exposure in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus in vitro[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22:741-749.
- [9] Ge S Y, Ruan D Y, Yu K, et al. Effects of Fe^{2+} on ion channels; Na^+ channel, delayed rectified and transient outward K^+ channels [J]. *Food Chem Toxicol*, 2001, 39: 1 271-1 278.
- [10] Sui L, Ruan D Y. Impairment of the Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate receptors by lead exposure in organotypic rat hippocampal slice cultures [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2000, 87: 204-210.
- [11] Zhang X Y, Liu A P, Ruan D Y, et al. Effect of developmental lead exposure on the expression of specific NMDA receptor subunit mRNAs in the hippocampus of neonatal rats by digoxigenin-labeled in situ hybridization histochemistry [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2002, 24:149-160.
- [12] Wang M, Ruan D Y, Chen J T, et al. Lack of effects of vitamin E on aluminum-induced deficit of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo[J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40: 471-478.
- [13] Yu K, Ge S Y, Dai X Q, et al. Effects of Pb^{2+} on the transient outward potassium current in acutely dissociated rat hippocampal neurons[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81:825-833.
- [14] Meng X M, Ruan D Y, Kang L L, et al. Age-related morphological impairments in the rat hippocampus following developmental lead exposure: An MRI, LM and EM study[J]. *Envir Toxicol Pharmacol*, 2003, 13: 187-197.
- [15] Ruan D Y. The effects of developmental lead exposure on morphology and electrophysiology of rat hippocampus and brain function of children [J]. *Toxicology*, 2003, 191:34-34.
- [16] Meng X M, Zhu D M, Ruan D Y, et al. Effects of chronic lead exposure on 1H MRS of hippocampus and frontal lobes in children [J]. *Neurology*, 2005, 64: 1 644-1 647.
- [17] He S J, Xiao C, Wu Z Y, et al. Caffeine-dependent stimulus-triggered oscillations in the CA3 region of hippocampal slices from rats chronically exposed to lead [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190: 525-534.
- [18] Yu K, Yu S S, Ruan D Y. Opposite effects of lead exposure on taurine-and HFS-induced LTP in rat hippocampus[J]. *Brain Res Bull*, 2005, 64:525-531.
- [19] Zhu D M, Wang M, Ruan D Y. Protection by a taurine supplemented diet from lead-induced deficits of long-term potentiation/depotentialiation in dentate gyrus of rats in vivo[J]. *Neuroscience*, 2005, 134: 215-224.
- [20] Gu Y, Wang L, Xiao C, et al. Effects of lead on voltage-gated sodium channels in rat hippocampal CA1 neurons[J]. *Neuroscience*, 2005, 133:679-690.
- [21] Sheng W, Hang H W, Ruan D Y. In vivo microdialysis study of the relationship between lead-induced impairment of learning and neurotransmitter changes in the hippocampus [J]. *Envir Toxicol Pharmacol*, 2005, 20:233-240.
- [22] Wang H L, Chen X T, Luo L, et al. Reparatory effects of nicotine on NMDA receptor-mediated synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region of chronically lead-exposed rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23: 1 111-1 119.
- [23] Li X M, Gu Y, She J Q, et al. Lead Inhibited N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiation involved ryanodine-sensitive calcium stores in rat hippocampal area CA1[J]. *Neuroscience*, 2006, 139:463-473.
- [24] Xiao C, Gu Y, Zhou C Y, et al. Pb^{2+} impairs GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal slices: a possible involvement of presynaptic calcium channels[J]. *Brain Res*, 2006, 1 088:93-100.
- [25] She J Q, Wang M, Zhu D M, et al. Effect of Ganglioside on synaptic plasticity of hippocampus in lead-exposed rats in vivo[J]. *Brain Res*, 2005, 1 060 (1/2):162-169.
- [26] Wang L, Luo L, Luo Y Y, et al. Effects of Pb^{2+} on muscarinic modulation of glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal CA1 area [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28:499-507.
- [27] Yu S S, Wang M, Li X M, et al. Influences of different developmental periods of taurine supplements on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of rats following prenatal and perinatal lead exposure [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7:51.
- [28] Chen W H, Wang M, Yu S S, et al. Cloquinol and vitamin B12 (cobalamin) synergistically rescue the lead-induced impairments of synaptic plasticity in hippocampal dentate gyrus area of the anaesthetized rats in vivo[J]. *Neuroscience*, 2007, 147:853-864.
- [29] Wang M, Chen W H, Zhu D M, et al. Effects of carbachol on lead-induced impairment of the long-term potentiation/depotentialiation in rat dentate gyrus in vivo [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45:412-418.
- [30] Li X M, Li C C, Yu S S, et al. JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1[J]. *Eur J Neurosci*, 2007,

- 25;391-396.
- [31] Li C C, Li X, Chen W, et al. The different roles of cyclinD1-CDK4 in STP and mGluR-LTD during the postnatal development in mice hippocampus area CA1 [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 57.
- [32] Finkelstein Y, Markowitz M E, Rosen J F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children; an update on central nervous system effects(Review)[J]. *Brain Res Rev*, 1998, 27: 168-176.
- [33] Brostrom C O, Wolff D J. Properties and functions of calmodulin(Review)[J]. *Biochem Pharmacol*, 1981, 30:1 395-1 405.
- [34] Alkondon M, Costa A C, Radhakrishnan V, et al. Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead [J]. *FEBS Lett*, 1990, 261:124-130.
- [35] Goebel D J, Poosc M S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain; a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 69:164-170.
- [36] Monyer H, Giffard R G, Hartley D M, et al. Oxygen or glucose deprivation-induced neuronal injury in cortical cell cultures is reduced by tetanus toxin [J]. *Neuron*, 1992, 8:967-973.
- [37] Ujihara H, Albuguergue E X. Development change of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, 263: 868-875.
- [38] Uteshev V, Büsselberg D, Haas H L. Pb^{2+} modulates the NMDA-receptor-channel complex [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1993, 347:209-213.
- [39] Guilarte T R, Miceli R C. Age-dependent effects of lead on $[^3H]$ MK-801 binding to the NMDA receptor-gated ionophore: in vitro and in vivo studies [J]. *Neurosci Lett*, 1992, 148(1/2):27-30.
- [40] Lasley S M. Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure [J]. *Neurotoxicology*, 1992, 13:625-635.
- [41] Shih T M, Hanin I. Effects of chronic lead exposure on levels of acetylcholine and choline and on acetylcholine turnover rate in rat brain areas in vivo [J]. *Psychopharmacology(Berl)*, 1978, 58: 263-269.
- [42] Costa L G, Fox D A. A selective decrease of cholinergic muscarinic receptors in the visual cortex of adult rats following developmental lead exposure [J]. *Brain Res*, 1983, 276:259-266.
- [43] Sierra E M, Rowles T K, Martin J, et al. Low level lead neurotoxicity in a pregnant guinea pigs model: neuroglial enzyme activities and brain trace metal concentrations [J]. *Toxicology*, 1989, 59:81-96.
- [44] Tischmeyer W, Kaczmarek L, Strauss M, et al. Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination [J]. *Behav Neural Biol*, 1990, 54:165-171.
- [45] Frank D A, Greenberg M E. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals(Review) [J]. *Cell*, 1994, 79:5-8.
- [46] Finkelsyein Y. Mechanism of lead-induced neurotoxicity [C]// '96 International Symposium on Childhood Lead Poisoning Prevention. Shanghai, 1996: 78-82.
- [47] Gurer H, Ozgunes H, Oztezcan S, et al. Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27: 75-81.