

亚慢性铝暴露对 SD 大鼠学习记忆功能及 海马细胞凋亡作用的研究^①

庞雅琴¹, 韦雨露², 李卓昕², 周敏¹, 黄永毅¹, 陆钦晨², 李金蔚³

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: pangyaqin@126.com;

2. 右江民族医学院 2014 级预防医学本科班, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院 2015 级临床医学本科 8 班, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨亚慢性铝暴露对 SD 大鼠学习记忆功能及海马细胞凋亡的影响。**方法** 将 40 只初断乳 SPF 级 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组(蒸馏水), 低、中、高浓度组(分别是 2 mg/ml、4 mg/ml、6 mg/ml AlCl_3), 采用自由饮水方式让大鼠连续染毒 AlCl_3 3 个月。采用 Morris 水迷宫试验来检测各组每只大鼠的认知能力。采用 HE 染色法检测大鼠海马的病理变化, TUNEL 法检测海马凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达水平。**结果** 与对照组相比, 低、中、高 AlCl_3 浓度组潜伏期长, 差异均有统计学意义($q=4.28, P<0.01; q=7.41, P<0.01; q=9.85, P<0.01$); 三组铝染毒大鼠停留目标象限时间均短于对照组($F=11.62, P<0.01$); 三组铝染毒大鼠穿越平台次数均少于对照组($F=16.90, P<0.001$)。三组不同浓度铝染毒组内两两比较显示, 高浓度组和中浓度组的潜伏期均长于和穿越平台次数均少于低浓度组, 高浓度组停留目标象限时间短于低浓度组和中浓度组, 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组相比, 铝暴露各浓度组大鼠海马神经元数目减少, 胶质细胞数量增多; 铝暴露组 Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增多, Bcl-2/Bax 比值降低, 凋亡细胞数增多。**结论** 亚慢性铝暴露可致大鼠学习记忆功能下降, 其机制可能与 AlCl_3 诱导海马细胞 Bcl-2 表达下调、Bax 表达上调有关。

关键词: 铝; 认知功能; 细胞凋亡

中图分类号: R749.16

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)05-0341-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.05.001

Effects of subchronic exposure to aluminum on learning and memory and the cell apoptosis of hippocampus in SD rats

Pang Yaqin¹, Wei Yulu², Li Zuoxin², Zhou Min¹, Huang Yongyi¹, Lu Qinchen², Li Jinwei³

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: pangyaqin@126.com;

2. Undergraduate Student, Grade 2014, Department of Preventive Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. Undergraduate Student, Class 8, Grade 2015, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study effects of subchronic aluminum exposure on learning and memory and the cell apoptosis of hippocampus in SD rats. **Methods** Forty SD rats with grade SPF at early ablactation were randomly divided into four groups: a control group, a low-concentration AlCl_3 group, a medium-concentration AlCl_3 and a high-concentration AlCl_3 group, 10 rats in each group. Rats of the control group drank stilled water freely, the low-, medium- and high-concentration groups freely drank 2 mg/ml AlCl_3 water solution, 4 mg/ml AlCl_3 water solution and 6 mg/ml AlCl_3 water solution respectively for three consecutive months for rats exposure to Al. The learning and memory abilities of rats were tested by the Morris water maze, the pathology

① **基金项目:**国家自然科学基金(81360438);广西自然科学基金(2013GXNSFAA019239, 2014GXNSFAA118145);2016 年自治区级大学生创新创业训练计划(201610599045, 201610599064)

changes of hippocampus were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining, the expressions of hippocampus-related Bcl-2, Bax protein were detected by TUNEL. **Results** The low-, medium- and high-concentration AlCl_3 groups had longer latency to find the platform, compared with the control group, there were statistically significant differences ($q = 4.28, P < 0.01; q = 7.41, P < 0.01; q = 9.85, P < 0.01$); the three groups of exposure to Al had shorter time spent in target quadrant than the control group ($F = 11.62, P < 0.01$); the three groups of exposure to Al had less numbers of through the original position than the control group ($F = 16.90, P < 0.001$). The two group comparison among the three groups exposure to Al showed that the latency to find the platform of medium- and high-concentration group were longer than the low-concentration group, the number of through the original position of medium- and high-concentration group were decreased than the low-concentration group, the time spent in target quadrant of high-concentration group was shorter than the middle- and low-concentration group, which had significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the control group, the number of hippocampal neurons in rats of different concentration groups exposure to Al decreased, while the number of glial cells increased. In groups of exposure to Al, the expression of Bcl-2 protein of hippocampus decreased, while the Bax protein increased and the ratio of Bcl-2 to Bax decreased. The number of apoptotic cells increased. **Conclusion** Subchronic exposure to Al may damage the learning and memory of rats, and is possibly related to AlCl_3 induction the downregulation of Bcl-2 expression, and upregulation of Bax expression of rat hippocampus.

Key words: aluminum; learning and memory ability; apoptosis

阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)是一种以学习记忆减退和认知行为功能障碍为表现的中枢神经系统退行性疾病,其发病率高,占总老年痴呆的 50%,给个人、家庭和社会带来了沉重的负担^[1]。研究表明,AD 发病的影响因素除遗传和机体衰老外,还包括大量的外源性因素如环境因素等^[2]。铝作为一种慢性蓄积性神经毒物,通过进入脑细胞产生严重的中枢神经系统毒性,给人们的生活及健康带来了极大的危害^[3]。本研究通过建立亚慢性铝暴露 SD 大鼠模型,探讨亚慢性铝暴露对大鼠学习记忆功能的影响以及对海马的病理改变和细胞凋亡作用的影响,这为 AD 疾病的监控和预防、保护高危人群提供理论依据。

1 材料方法

1.1 试剂和仪器 无水 AlCl_3 (分析纯,由沈阳试剂五厂),Morris 水迷宫测试系统(RB-100A,由北京新天地科技有限公司提供)。

1.2 动物分组及染毒 选择 SPF 级 SD 大鼠 40 只,体重 120~150 g,由右江民族医学院动物实验中心提供。适应性饲养一周后,将大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。分别为对照组(自由饮用蒸馏水),低、中、高浓度组(分别自由饮用 2 mg/ml、4 mg/ml、6 mg/ml AlCl_3 水溶液),连续染毒 3 个月。每天测量体重。在饲养过程中,笼具、饮水瓶等均不使用含铝制品。大鼠每天正常饮水、喂饲料。

1.3 大鼠神经行为学测试 染毒结束后,采用 Morris 水迷宫测定大鼠空间学习记忆能力。①定位航行实验:实验连续进行 5 d,每天 2 次,每天在相同的时间

进行。记录大鼠分别从 4 个不同象限入水点入水找到平台所需的时间,计算其逃避到平台上的潜伏期,检测大鼠的空间学习能力。②空间探索实验:第 5 d 撤去平台,将受试大鼠从任一入水点面向池壁放入水中,记录 60 s 内大鼠首次找到原平台位置的时间,检测大鼠的空间记忆能力。

1.4 海马形态学观察 水迷宫实验结束后,处死大鼠,取出海马组织,用 4% 多聚甲醛灌流固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色。

1.5 TUNEL 法检测海马凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达 将多聚甲醛固定的海马常规石蜡包埋切片,干燥后脱蜡、脱水,PBS 洗涤,以 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶进行抗原修复后,正常羊血清室温封闭 1 h,加入特异性一抗(1:200),4℃ 孵育过夜,37℃ 复温 30 min,PBS 洗涤,加入 1:500 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,室温孵育 1 h;PBS 洗片,DAB 显色,苏木精复染。对照组用 10% 的正常羊血清代替一抗。

1.6 统计学方法 所得实验数据用 SPSS 13.0 进行处理分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较用方差分析,组间两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 铝暴露对大鼠学习能力的影响 与对照组相比,低、中、高浓度组潜伏期长,差异均有统计学意义($q = 4.28, P < 0.01; q = 7.41, P < 0.01; q = 9.85, P < 0.01$);高浓度组和中浓度组的潜伏期均长于低浓度组,差异均有统计学意义($q = 5.58, P < 0.01; q =$

3.13, $P < 0.05$);高浓度组的潜伏期与中浓度组比较,差异无统计学意义($q = 2.25, P > 0.05$),见表 1。

表 1 不同铝暴露染毒浓度对大鼠学习能力的影 响 ($n = 10$)

组别	剂量 (mg/ml)	潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)
对照组	0	30.12 $\pm$ 4.51
低浓度 AlCl ₃ 组	2	37.35 $\pm$ 5.25 ^a
中浓度 AlCl ₃ 组	4	42.64 $\pm$ 4.89 ^{ab}
高浓度 AlCl ₃ 组	6	46.78 $\pm$ 6.52 ^{ab}
<i>F</i>		18.10
<i>P</i>		<0.001

注:与对照组比较,a: $P < 0.01$;与低浓度组比较,b: $P < 0.05$

2.2 铝暴露对大鼠记忆能力的影响 与对照组相比,低、中、高浓度组停留目标象限时间短,差异均有统计学意义($q = 3.03, P < 0.05$; $q = 4.64, P < 0.05$; $q = 8.18, P < 0.01$);高浓度组停留目标象限时间短于低浓度组和中浓度组,差异均有统计学意义($q = 5.15, P < 0.01$; $q = 3.54, P < 0.05$);低浓度组的停留目标象限时间与中浓度组比较,差异无统计学意义($q = 1.61, P > 0.05$)。与对照组相比,低、中、高浓度组穿越平台次数少,差异均有统计学意义($q = 3.12, P < 0.01$; $q = 6.95, P < 0.05$; $q = 9.30, P < 0.01$);高浓度组和中浓度组穿越平台次数均低于低浓度组,差异均有统计学意义($q = 6.18, P < 0.01, q = 3.82, P < 0.05$);高浓度组穿越平台次数与中浓度组

比较,差异无统计学意义($q = 2.35, P > 0.05$),见表 2。

表 2 不同铝暴露染毒浓度对大鼠记忆能力的影 响 ($n = 10$)

组别	剂量 (mg/ml)	目标象限时间 ($\bar{x} \pm s, s$)	穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s, 次$)
对照组	0	43.21 $\pm$ 5.21	5.54 $\pm$ 1.55
低浓度 AlCl ₃ 组	2	38.09 $\pm$ 5.45 ^{ab}	4.20 $\pm$ 1.39 ^a
中浓度 AlCl ₃ 组	4	35.36 $\pm$ 5.46 ^{ab}	2.56 $\pm$ 1.55 ^{ab}
高浓度 AlCl ₃ 组	6	29.37 $\pm$ 5.27 ^{ab}	1.55 $\pm$ 0.79 ^{ab}
<i>F</i>		11.62	16.90
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,a: $P < 0.01$;与低浓度组比较,b: $P < 0.05$

2.3 铝暴露对大鼠海马组织病理形态学的影响 对照组大鼠海马神经元细胞排列整齐、结构完整、轮廓清楚、胞核居中、核仁明显;胶质细胞分散在海马神经元之间,呈星形或梭形,体积小,核圆形或卵圆形(见图 1A)。铝暴露各浓度组小鼠海马神经元胞体变小、核固缩、胞浆减少,胶质细胞体积增大,数量增多(见图 1B、图 1C、图 1D)。

2.4 铝暴露对大鼠海马凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响 Bcl-2、Bax 蛋白表达细胞内可见棕黄色颗粒,主要位于胞质内。与对照组相比,铝暴露组 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2/Bax 比值降低,凋亡细胞数增多。见图 2、图 3。

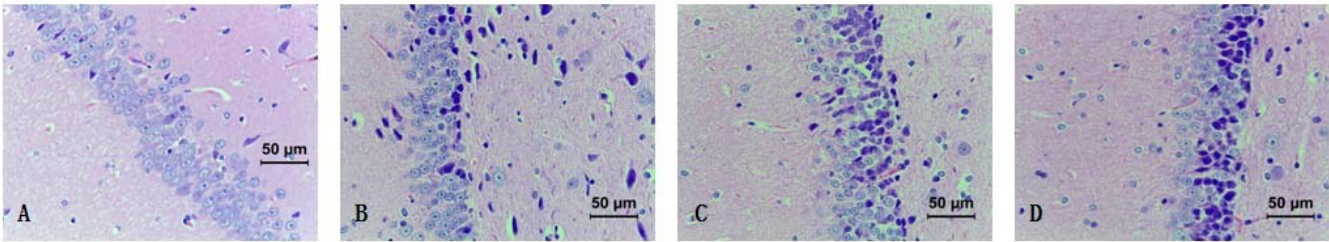


图 1 铝暴露对大鼠海马形态学的影响(HE 染色,×400)
注:A. 对照组;B. 低浓度组;C. 中浓度组;D. 高浓度组

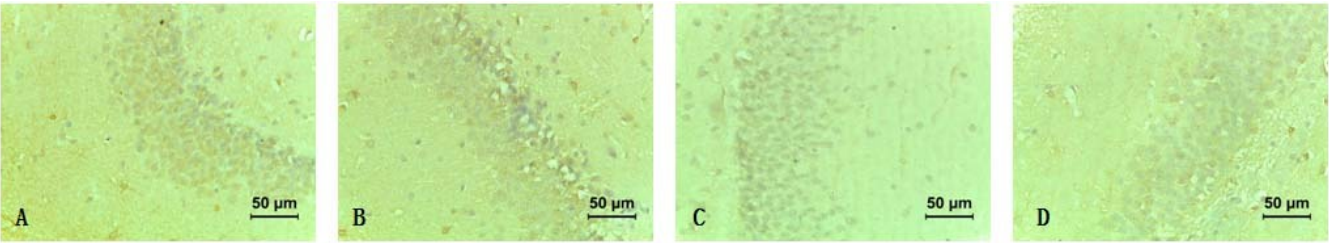


图 2 铝暴露对大鼠海马 Bcl-2 的影响(TUNEL 法,×400)
注:A. 对照组;B. 低浓度组;C. 中浓度组;D. 高浓度组

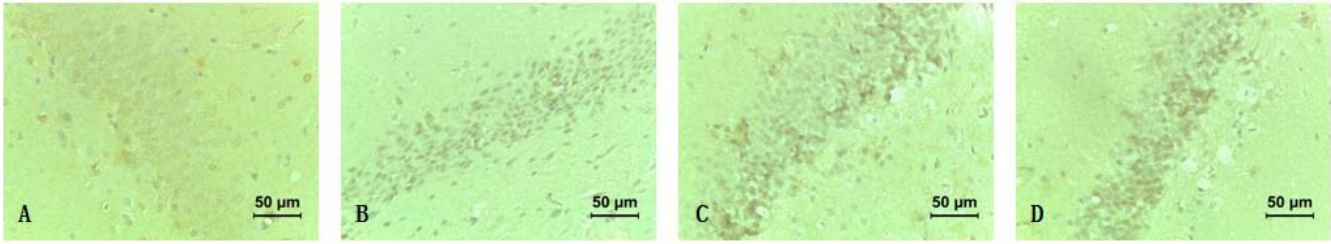


图 3 铝暴露对大鼠海马 Bax 蛋白表达的影响(TUNEL 法,×400)
注: A. 对照组;B. 低浓度组;C. 中浓度组;D. 高浓度组

3 讨论

铝是地壳中含量最丰富的金属元素之一,随着社会的发展,铝的应用愈发广泛,人们通过日常接触和职业接触铝的机会也越多。研究发现,阿尔茨海默病的病人脑组织中铝的含量是正常人的 1.5~30 倍,在神经原纤维缠结区脑组织中铝含量明显升高^[4]。提示了铝是 AD 等神经退行性疾病的重要环境因素。本实验结果表明,亚慢性铝暴露大鼠出现逃避潜伏期延长、停留目标象限时间短、穿越平台次数少,提示铝暴露可诱导大鼠空间学习和记忆能力的下降,这与以往的研究结果均相一致^[5-7],表明铝可能参与了 AD 的发生与发展。

目前有关 AD 的发病机制研究涉及胆碱能改变、基因突变、表观遗传学改变及能量代谢障碍等,而典型的病理改变主要为大脑的皮质神经元数目减少和萎缩,出现老年斑和神经原纤维缠结^[8],本研究发现,亚慢性铝暴露各浓度组大鼠海马神经元胞体变小、胞核固缩、胞浆减少,这与高丽萍等^[9]的研究结果相一致。而许多研究表明,AD 脑内神经元的丢失与细胞凋亡有关^[10],细胞凋亡是一种程序式的细胞死亡方式,而 Bax、Bcl-2 基因与凋亡的调控关系尤为密切^[11]。有研究表明 Bcl-2、Bax 基因参与了 AD 介导的神经细胞凋亡^[11],本实验发现,与对照组相比,铝暴露组海马凋亡细胞数增多,Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多,Bcl-2 /Bax 比值降低。这提示海马细胞凋亡的发生与铝暴露相关,而研究表明铝在海马蓄积的浓度较高于其它组织,是铝的重要靶器官,而海马是学习记忆的重要器官,海马受到损伤时,学习记忆能力可以表现出相应的受损^[12]。因而进一步提示铝可能通过诱导海马神经细胞的凋亡而导致海马细胞的损伤,进而引起学习记忆功能的障碍。其机制可能与铝诱导海马细胞 Bcl-2 表达下调、Bax 表达上调有关。

本实验成功建立亚慢性铝暴露 SD 大鼠学习记忆功能障碍的实验模型,这为寻找预测毒物暴露和疾病发生早期的分子标记物提供依据,对于疾病的监控和预防,保护高危人群具有十分重要的意义。

参考文献:

[1] Ribes D,Colomina MT,Vicens P,et al. Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure[J]. Current Alzheimer Research,2010,7(5):401-408.

[2] 程书珍,王晓梅,刘恒,等. 铝诱导阿尔茨海默病模型大鼠的发病机制的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2012,29(1):41-43.

[3] 翟金霞,冯丫娟,张俊青,等. 电解工人血清铝含量与慢性认知功能缺损关系的研究[J]. 现代预防医学,2009,36(11):2018-2020.

[4] Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D,et al. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort[J]. Am J Epidemiol,2009,169(4):489-496.

[5] 李俊,崔鑫,赵岩,等. 慢性铝暴露对大鼠海马钙调蛋白及 cAMP 反应元件结合蛋白的影响[J]. 环境与健康杂志,2013,30(8):682-684.

[6] 胡红柳,宾慧婷,蓝贤英,等. 慢性铝暴露 AD 大鼠学习记忆功能障碍及绿茶多酚的干预作用研究[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(3):262-264.

[7] Liang RF,Li WQ,Wang XH,et al. Aluminium- maltolite-induced impairment of learning, memory and hippocampal long- term potentiation in rats[J]. Ind Health, 2012,50(5):428-436.

[8] 曾亮,祝云,王赛,等. 氯化铝对大鼠基底前脑内侧隔核神经元 APP 蛋白表达的影响[J]. 沈阳医学院学报,2014,16(1):18-20.

[9] 高丽萍,程书珍,王晓梅,等. 铝对大鼠学习记忆及海马神经细胞凋亡影响[J]. 中国公共卫生,2009,25(2):214-215.

[10] 曾芳,何宇恒,彭静,等. 电针对 SAMP8 小鼠海马神经元凋亡蛋白 Caspase-3, Caspase-9 及凋亡抑制蛋白 XIAP 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2008,28(6):521-523.

[11] 高丽萍,程书珍,王晓梅,等. 铝对大鼠海马组织形态学及细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2009,29(12):1489-1491.

[12] Fattoretti P,Bertoni-Freddari C,Balietti M,et al. Chronic aluminum administration to old rats results in increased levels of brain metal ions and enlarged hippocampal mossy fibers[J]. Ann N Y Acad Sci,2004,1019:44-47.

收稿日期:2017-09-25