

慢性铝暴露小鼠学习记忆与 SOD、GSH-Px 和 MDA 关系的研究^①

莫颂轶,余双全,张丽凤,黄彦峰,廖素婵,黄永毅,梁祚仁,黎昀,蒋敏丽,黄俊杰^②

(右江民族医学院应用生理研究室,广西 百色 533000 E-mail:110056608@qq.com)

摘要:目的 探讨慢性铝暴露对小鼠学习记忆的影响及其与血清、肝脏、肾脏、心脏等组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量的关系。**方法** 将32只小鼠随机分为高、中、低剂量染毒组和对照组,每组8只动物模型不同剂量组每日分别饲喂含不同质量浓度三氯化铝(AlCl_3)的饲料,铝染毒高、中、低剂量组饲料中铝添加比例分别为120 mg/kg、12 mg/kg、1.2 mg/kg 体重剂量,对照组正常饲养。染毒90 d后,Y型迷宫实验测试小鼠学习记忆能力;对小鼠血清、肝、肾、心采样,测试其中SOD活力、GSH-Px活性和MDA含量。**结果** 各剂量铝染毒组小鼠学习测试次数和记忆错误次数均高于对照组,与对照组相比,中、高剂量组学习测试次数及记忆错误次数差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,高剂量铝染毒组血清、肝脏、肾脏、心脏SOD活力和GSH-Px活性均明显降低,与低剂量组比较,高剂量铝染毒组血清、肝脏SOD活性下降;而高剂量铝染毒组血清、肝脏、肾脏、心脏MDA含量均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson相关性分析显示,学习记忆下降主要与高剂量铝暴露大鼠血清、肝脏、肾脏中SOD和GSH-Px降低呈负相关,与MDA升高呈正相关。**结论** 铝可能通过降低血清、肝、肾、心SOD活力和GSH-Px活性,升高MDA含量,使心、肝、肾等多器官受损,进而影响小鼠学习记忆能力,这可能是铝致小鼠认知能力障碍的机制之一。

关键词: 铝暴露;学习记忆;超氧化物歧化酶;丙二醛;小鼠

中图分类号: R135 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)04-0308-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.04.004

Research on the relationship between the learning and memory ability and the levels of SOD, GSH-Px and MDA in mice with chronic exposure to aluminum

Mo Songyi, Yu Shuangquan, Zhang Lifeng, Huang Yanfeng, Liao Suchan, Huang Yongyi,
Liang Zuoren, Li Yun, Jiang Minli, Huang Junjie

(Institute of Applied Physiology, Youjiang Medical University for Nationalities,
Baise 533000, Guangxi, China E-mail:110056608@qq.com)

Abstract: **Objective** To explore effects of chronic exposure to aluminum on the mice ability of learning and memory and its relationship to the levels of SOD, GSH-Px and MDA in mice serum, liver, kidney and heart. **Methods** Thirty-two mice were randomly divided into four groups: a high-dose aluminum chloride (AlCl_3) exposure group (high-dose group), a moderate-dose AlCl_3 exposure group (moderate-dose group), a low-dose AlCl_3 exposure group (low-dose group) and a control group. Each group consisted of 8 mice. AlCl_3 was added to the mice daily diets at dosages of 120 mg/kg, 12 mg/kg, and 1.2 mg/kg for the high-, moderate-, and low-dose groups respectively. The control group was fed with normal diet. Ninety days later, the spatial learning and memory ability were evaluated by Y-maze. Mice serum, liver, kidney and heart were sampled and the activity of SOD and GSH-Px, the level of MDA were measured. **Results** The mice in each AlCl_3 exposure group had higher learning test times and memory error times than those of the control group. Compared with the control group, the learning test times and memory error times of moderate- and high-dose groups were statistically significant difference ($P < 0.05$). Compared with the control group, the activities of SOD and GSH-Px in serum, liver, kidney and heart in high-dose group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the low-dose group, serum and liver SOD activity decreased in the high-dose group; the activity of MDA in serum, liver, kidney and heart increased significantly in high dose groups, there were all statistical differences ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the learning and memory decrease were mainly negatively correlated with the decrease of SOD and GSH-Px levels and were positively correlated with the increase of MDA in the serum, liver and kidney of the mice exposed to high doses of aluminum. **Conclusion** A-

① 基金项目:广西高校科学技术研究项目重点课题(ZD2014101)

② 通信作者,E-mail:1559199466@qq.com

luminum may reduce SOD, GSH-Px activity and increase MDA level in mice serum, liver, kidney and heart, which will cause the injury of multiple organs such as heart, liver and kidney and further impact on the mice learning and memory ability, and this may be one of mechanisms underlying aluminum-induced impairment of mice cognitive ability.

Key words: aluminum exposure; learning and memory; superoxide dismutase; malondialdehyde; mice

随着铝制品的广泛应用及日常生活中人类接触铝的情况日益增多,从而增加铝在体内蓄积进而损害人体健康^[1-2]。铝是一种慢性蓄积性神经毒物,可引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等痴呆症状^[3-4]。但慢性铝暴露损伤学习记忆的机制尚未完全明确,造成了慢性铝暴露防治的困难。本实验通过建立慢性铝暴露小鼠动物模型,测试慢性铝暴露小鼠的学习记忆能力,以及测定血清、肝脏、肾脏、心脏中 SOD 活力、GSH-Px 活性和 MDA 含量,探讨慢性铝暴露对小鼠学习记忆的影响与血清、肝脏、肾脏、心脏等组织中 SOD 活力、GSH-Px 活性和 MDA 含量的关系,为铝暴露的预防提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级昆明小鼠 32 只,由右江民族医学院实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(桂)2017-0003]提供,12 周龄,体重 20~22 g,雌雄分笼饲养,每笼 8 只。

1.2 主要实验试剂及仪器 三氯化铝(AlCl_3) (天津市大茂化学试剂厂),SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒、MDA 试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);UV-1700 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FSH-2 可调高速匀浆机(江苏省金坛市宏华仪器厂),Y 型迷宫刺激器(MG-B,张家港市教学实验器械厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和铝染毒模型建立^[5-6] 取小鼠 32 只,雌雄各半,随机分成高、中、低剂量染毒组和对照组,每组 8 只。高、中、低剂量铝染毒组用 16 g/L 浓度的 AlCl_3 水溶液,每天分别按 120 mg/kg、12 mg/kg、1.2 mg/kg 体重剂量,拌入饲料中喂养小鼠,直至实验结束,连续 3 个月;对照组普通饲料正常饲养。小鼠的组织取材于右江民族医学院应用生理研究室进行,实验动物使用许可证号为:SYXK(桂)2017-0004。

1.3.2 小鼠学习记忆能力测试 小鼠的学习和记忆行为能力用 Y 型迷宫刺激器进行检测。Y 型迷宫由 3 只短臂组成,以小鼠所在短臂为起步区,另两只短臂中随机选择一只为安全区,一只为非安全区。安全区灯泡开亮,铜栅无电流;起步区和非安全区灯泡不亮,铜栅有电流。若小鼠在灯光亮起时能成功逃向安全区,则记为“正确”,否则记为“错误”。按文献^[7-8]的实验方法和学会标准,将小鼠达到学会标准时所需的测试次数作为学习成绩。学习能力检测 24 h 后,依照上述方

法对小鼠连续进行 20 次测试,记录大鼠在 20 次测试中的错误次数作为记忆成绩。

1.3.3 样本采集 各组小鼠于饲喂三个月后,眼眶取血,制备血清待测。然后脱颈椎法处死小鼠,分别解剖快速取出肝脏、肾脏、心脏,用冰生理盐水漂洗置于滤纸吸干,切取组织块 0.4 g,置于匀浆试管中,加入冰生理盐水 3.6 ml 后进行匀浆,离心取上清液,待测。

1.3.4 血清、肝、肾、心主要观察指标 用紫外线可见分光光度计分别测定小鼠血清及肝脏、肾脏、心脏组织匀浆上清各管吸光度值,SOD 活力检测采用黄嘌呤氧化酶法,GSH-Px 活性采用二硫代硝基苯甲酸缩合法,MDA 含量检测采用硫代巴比妥酸法,采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量。测试步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组数据组间比较采用单因素方差分析比较,两组间比较采用 LSD 法,学习记忆能力与各指标间的关系采用 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 低剂量染毒组和对照组小鼠均活泼好动,饮食没有明显改变,毛色较光亮;中、高剂量染毒组小鼠活动减少,进食量减少,毛发蓬松少光泽。

2.2 小鼠 Y 型迷宫实验学习和记忆的检测结果 Y 型迷宫实验结果显示:各组间学习测试次数和记忆错误次数差异均有统计学意义($P < 0.001$)。与对照组相比,高、中剂量慢性铝暴露组学习测试次数明显增多($P < 0.01$);与对照组相比,高、中剂量的慢性铝暴露组记忆错误次数均明显增多,且其增多幅度随着铝染毒剂量的增高而增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$);低剂量组学习测试次数和记忆错误次数均无显著性变化,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 小鼠 Y-迷宫学习和记忆的检测结果 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	学习测试次数	记忆错误次数
对照组	8	15.13 ± 1.64	4.25 ± 1.04
低剂量组	8	17.00 ± 1.31	5.88 ± 1.36
中剂量组	8	20.13 ± 2.30 ^{bd}	7.88 ± 1.46 ^{ac}
高剂量组	8	22.25 ± 2.71 ^{bd}	10.88 ± 2.23 ^{ad}

注:与对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与低剂量组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

2.3 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 SOD 活性的测定结果 SOD 活性测定结果显示:除了中剂量组血清 SOD 活性比对照组明显降低外($P < 0.01$),低、中剂量组肝、肾和心 SOD 活性与对照组无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,高剂量慢性铝暴露组血清、肝脏、肾脏、心脏 SOD 活性均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与低剂量组比较,高剂量慢性铝暴露组血清、肝脏 SOD 活性明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。

表 2 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 SOD 活性的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清 (U/ml)	肝脏 (U/mg)	肾脏 (U/mg)	心脏 (U/mg)
对照组	123.15±9.55	130.36±15.07	69.98±10.41	107.04±9.84
低剂量组	114.89±4.20	127.06±13.77	66.51±9.11	103.58±9.25
中剂量组	102.21±11.02 ^{bd}	121.90±14.94	62.23±9.83	105.48±6.09
高剂量组	92.47±6.94 ^{bd}	106.64±14.09 ^{ac}	55.46±8.05 ^a	95.15±5.62 ^a

注:与对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与低剂量组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

2.4 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 MDA 含量的测定结果 MDA 含量测定结果显示:各组间小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 MDA 含量差异均有统计学意义($P < 0.01$)。低剂量组血清、肝脏、肾脏、心脏 MDA 含量与对照组相比无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组及低剂量组相比,高剂量慢性铝暴露组血清、肝脏、肾脏、心脏 MDA 含量均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 MDA 含量的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清 ($\mu\text{mol/L}$)	肝脏 ($\mu\text{mol/L}$)	肾脏 ($\mu\text{mol/L}$)	心脏 ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	11.81±1.71	27.08±6.28	39.17±5.56	65.83±11.28
低剂量组	12.35±1.94	26.29±5.08	41.44±2.34	64.54±6.76
中剂量组	14.29±2.85	32.28±5.55	45.50±5.31	72.02±8.34
高剂量组	17.28±2.37 ^{bd}	38.34±5.03 ^{bd}	64.02±8.39 ^{bd}	76.88±6.39 ^{ac}

注:与对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与低剂量组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

2.5 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 GSH-Px 活力的测定结果 GSH-Px 活力测定结果显示:与对照组相比,高剂量慢性铝暴露组血清、肝脏、心脏 GSH-Px 活力均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),中剂量慢性铝暴露组血清、肝脏 GSH-Px 活力下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$);与低剂量组相比,高剂量慢性铝暴露组血清、肝脏、肾脏 GSH-Px 活力下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),中剂量组的血清

GSH-Px 活力下降($P < 0.05$),见表 4。

表 4 小鼠血清、肝脏、肾脏、心脏 GSH-Px 活力的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清 (U/ml)	肝脏 (U/mg)	肾脏 (U/mg)	心脏 (U/mg)
对照组	35.86±2.55	16.68±1.66	39.84±6.91	21.73±3.64
低剂量组	31.41±5.22 ^a	15.77±3.30	37.33±5.86	20.37±1.98
中剂量组	26.60±2.55 ^{bc}	13.47±2.38 ^a	35.68±5.34	18.50±3.50
高剂量组	25.70±2.25 ^{bc}	10.69±1.27 ^{bd}	29.54±2.62 ^{bc}	16.87±2.22 ^a

注:与对照组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与低剂量组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

2.6 小鼠学习和记忆与 SOD、MDA 及 GSH-Px 的相关性分析 Pearson 相关性分析显示,中、高剂量铝染毒组血清中 SOD、GSH-Px 与学习测试次数、记忆错误次数均呈负相关,而血清 MDA 与学习测试次数、记忆错误次数呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高剂量铝染毒组肝脏、肾脏中 SOD、GSH-Px 与学习测试次数、记忆错误次数均呈负相关,而肝脏、肾脏 MDA 与学习测试次数、记忆错误次数呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 5。

表 5 小鼠学习和记忆与 SOD、MDA 及 GSH-Px 的相关性分析 ($n = 8$)

组织中指标	学习测试次数		记忆错误次数	
	r	P	r	P
中剂量组				
血清 SOD	-0.799	0.017	-0.721	0.044
血清 MDA	0.775	0.024	0.841	0.009
血清 GSH-Px	-0.829	0.011	-0.801	0.017
高剂量组				
血清 SOD	-0.904	0.002	-0.803	0.016
血清 MDA	0.832	0.010	0.760	0.029
血清 GSH-Px	-0.707	0.050	-0.734	0.038
肝脏 SOD	-0.800	0.017	-0.886	0.003
肝脏 MDA	0.896	0.003	0.775	0.024
肝脏 GSH-Px	-0.717	0.046	-0.855	0.007
肾脏 SOD	-0.827	0.011	-0.767	0.026
肾脏 MDA	0.824	0.012	0.893	0.013
肾脏 GSH-Px	-0.783	0.022	-0.953	<0.001

3 讨论

学习和记忆是脑的高级功能活动,是一切认知活动的基础。当大脑学习和记忆高级功能活动加工过程出现异常时可导致认知功能障碍^[9]。慢性铝暴露使铝在体内脑、心、肝、肾、骨、肺等多个组织器官中蓄积,特别是铝可通过血脑屏障进入脑组织产生神经行为毒性作用,主要表现为学习和记忆能力下降以及运动失调等^[10-11]。

目前对铝的慢性毒性研究中,慢性铝中毒的动物

模型常以腹腔注射或灌胃方法进行,这与人体实际摄铝方式不一致。鉴于此,本研究用接近人体经食物摄铝方式进行实验,各铝染毒组用 AlCl_3 水溶液按不同的剂量拌入饲料中喂养小鼠,对小鼠染毒三个月,进行动物建模研究,从血清、肝脏、肾脏、心脏等多个组织,及 SOD 活力、GSH-Px 活性、MDA 含量等多个指标,探讨慢性铝暴露小鼠学习记忆的影响与血清、肝脏、肾脏、心脏等组织中 SOD 活力、GSH-Px 活性和 MDA 含量的关系。本研究结果显示:铝暴露组 Y 型迷宫实验学习训练次数和错误次数均高于对照组,且其增多幅度随着铝染毒剂量的增高而增多,这说明慢性铝暴露可致小鼠学习记忆能力下降,这与文献报道^[12-13]一致,提示不同剂量的铝暴露组引起大脑铝蓄积,导致小鼠学习记忆功能障碍。不同剂量的铝暴露,随着铝染毒剂量的增高,小鼠学习训练次数和错误次数均明显增多,同时血清、肝脏、肾脏 SOD 活力和 GSH-Px 活性均明显降低,但 MDA 含量明显升高。本研究用 Pearson 相关性分析表明学习测试次数、记忆错误次数增多主要与高剂量铝暴露血清、肝脏、肾脏中 SOD 和 GSH-Px 降低,与 MDA 升高有密切关系;学习记忆能力下降与高剂量铝暴露血清、肝脏、肾脏中 SOD 和 GSH-Px 降低呈负相关,与 MDA 升高呈正相关。进入机体的铝与脂质过氧化有密切联系,铝可引起脂质过氧化增强和产生自由基增多,自由基攻击膜脂中的不饱和脂肪酸,从而使脂质过氧化产物 MDA 含量升高。本研究结果表明,铝染毒后均引起心、肝、肾组织中 MDA 含量升高,心、肝、肾组织中 SOD 活力和 GSH-Px 活性降低,说明铝中毒小鼠处于氧化应激状态,通过脂质过氧化造成小鼠心、肝、肾等多个器官的损害,进而继发引起小鼠学习和记忆的下降。同时,铝染毒后小鼠血液中 SOD 活力和 GSH-Px 活性降低、MDA 含量升高,说明体内氧自由基增多,氧自由基的损伤作用是神经细胞凋亡发生的重要机制之一。体内氧自由基引起的 DNA 损伤可激活 P53 基因引起细胞凋亡;氧自由基的氧化应激可活化核转录因子 NF- κ B 和 Caspase 家族基因,诱发细胞凋亡;氧自由基氧化应激引起细胞膜结构的破坏,可改变细胞膜的通透性使 Ca^{2+} 内流增加,诱导细胞凋亡。因此,铝染毒后导致小鼠神经细胞凋亡增加,从而使小鼠学习记忆受到损伤^[14-16]。

综上所述,铝可能通过降低血清、心、肝、肾中 SOD 活力和 GSH-Px 活性,升高 MDA 含量,使脑、心、肝、肾等多器官受损,进而影响小鼠学习记忆能力,这可能是铝导致小鼠认知能力障碍的作用机制之一。但铝导致小鼠认知能力障碍的具体机制特别是脑组织内的相关分子机制,还有待于进一步研究和探讨。

参考文献:

- [1] 任佩,李瑞,樊瑾,等.中青年铝作业工人认知记忆功能评价研究[J].中国职业医学,2016,43(1):15-19,25.
- [2] 李瑞,任佩,崔双杰,等.职业铝接触工人认知功能的改变及血浆中 CDK5 与磷酸化 tau 蛋白的关系[J].环境与职业医学,2016,33(7):633-637.
- [3] Pan BL, Niu Q, Zhang L. Effects of chronic aluminum exposure on learning and memory and brain-derived nerve growth factor in rats[J]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2013, 31(10):740-743.
- [4] 原宇宙,杨晓娟,任佩,等.铝致大鼠认知能力和全基因组甲基化改变的研究[J].卫生研究,2015,44(3):359-363.
- [5] 李秋营,杨艳旭,张太强,等.实验性大鼠铝中毒模型建立[J].山西医药杂志,2002,31(2):113-115.
- [6] 林巧,曹云鹏.长期经口铝摄入对大鼠记忆行为的影响[J].中国临床康复,2003,7(25):3446-3447.
- [7] 荆治华,未小明,王少虎,等.一氧化氮和烟碱型乙酰胆碱受体在大鼠学习记忆中的联合作用[J].生理学报,2014,66(3):307-314.
- [8] 徐卫平,龚珊,蒋星红,等.Y型迷宫对成年大鼠海马齿状回细胞的增殖作用[J].苏州大学学报(医学版),2005,25(3):366-369.
- [9] 郑前敏,徐平.认知功能相关的动物行为学实验研究进展[J].中国比较医学杂志,2016,26(7):85-89.
- [10] 周泽文,庞雅琴,漆光紫,等.职业性铝接触对作业工人心理、神经行为、认知及自主神经功能的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2015,35(2):242-247.
- [11] Molloy DW, Standish TI, Nieboer E, et al. Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans[J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 70(23):2011-2019.
- [12] Xin Cui, Biao Wang, Zhihong Zong, et al. The effects of chronic aluminum exposure on learning and memory of rats by observing the changes of Ras/Raf/ERK signal transduction pathway[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(2):315-319.
- [13] Biao Wang, Jiuhuan Zhao, Meng Yu, et al. Disturbance of Intracellular Calcium Homeostasis and CaMKII/ CREB Signaling is Associated with Learning and Memory Impairments Induced by Chronic Aluminum Exposure[J]. Neurotox Res, 2014, 26(1):52-63.
- [14] 冯彤,刘萍,张震,等.1,2-二甲基-3-羟基-4-吡啶酮和牛磺酸联合干预对铝染毒大鼠大脑皮层抗氧化系统的保护作用[J].环境与健康杂志,2015,32(11):973-976.
- [15] 牛侨,张勤丽,牛丕业,等.铝对体外培养大鼠神经细胞凋亡的研究[J].卫生研究,2007,36(4):407-413.
- [16] 殷金珠,牛侨.铝和苯并[a]芘联合染毒对神经细胞凋亡的影响[J].毒理学杂志,2014,28(2):134-138.

收稿日期:2018-07-31