

本文引文格式:杨玲玲,梁仲威,庞雅琴,等. Nrf2 敲除加重铝诱导小鼠海马神经元的损伤作用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(2): 158-162.

【论著与临床报道】

Nrf2 敲除加重铝诱导小鼠海马神经元的损伤作用研究

杨玲玲¹, 梁仲威², 庞雅琴¹, 李文学³, 岑育芳¹, 韦俊宏¹, 王一涵¹, 漆光紫¹

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;

2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080;

3. 广东省广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440)

摘要:目的 利用 Nrf2 敲除 FVB 小鼠, 探讨 Nrf2 在铝诱导的海马神经元损伤中的作用及机制。方法 取 8 周龄 WT 小鼠和 Nrf2^{-/-} 的 FVB 小鼠各 20 只, 将两组小鼠各随机分为: WT 对照组、WT 铝暴露组、HO 对照组、HO 铝暴露组, 每组 10 只。铝暴露组采用 220 mg/kg 乳酸铝灌胃染毒 3 个月, 对照组采用蒸馏水灌胃, q-PCR 检测海马 Nrf2 的 mRNA 表达量, 免疫组化法检测海马区 Nrf2 蛋白表达量。HE 染色观察小鼠海马病理变化; Nissl 染色观察小鼠海马中尼氏小体数量。结果 与 WT 对照组相比, WT 铝暴露组、HO 对照组、HO 铝暴露组的 Nrf2 mRNA 和蛋白表达明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 HO 对照组相比, HO 铝暴露组的 Nrf2 mRNA 和蛋白表达无明显趋势, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 WT 对照组相比, WT 铝暴露组的海马神经元出现核固缩, 神经元排列疏松, 尼氏小体形态不规则等病理改变; 与 WT 铝暴露组相比, HO 铝暴露组海马神经元病理改变更为明显, 有大量神经元边界不清, 胞质形态不清晰, 尼氏小体数量减少, 形态异常, 边界不规则。结论 铝暴露会导致小鼠海马发生病理损伤, Nrf2 敲除加重铝诱导的神经毒性。

关键词: 铝暴露; 神经毒性; 氧化应激; Nrf2

中图分类号: R114

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2022)02-0158-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.004

Influence of Nrf2 knock-out on aggravating aluminum-induced damage of hippocampal neurons in mice

Yang Lingling¹, Liang Zhongwei², Pang Yaqin¹, Li Wenxue³,
Cen Yufang¹, Wei Junhong¹, Wang Yihan¹, Qi Guangzi¹

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

2. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China;

3. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** FVB mice were knocked out with Nrf2 to investigate the role and mechanism of Nrf2 in aluminum-induced hippocampal neuron damage. **Methods** Twenty 8-week-old WT mice and twenty Nrf2^{-/-} FVB mice were selected. Mice were randomly divided into WT control group, WT aluminum exposure group, HO control group and HO aluminum exposure group, with 10 mice in each group. Mice in the aluminum exposure group were given 220 mg/kg aluminum lactate by intragastric administration for 3 months. Mice in the control group were given distilled water by intragastric administration. The mRNA expression of Nrf2 in hippocampus was detected by q-PCR. The protein expression of Nrf2 in hippocampus was detected by immunohistochemistry. HE staining was employed to observe the pathological changes of hippocampus in mice. Nissl

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960595、81660549); 广西自然科学基金项目(2019JJD140011)

第一作者简介: 杨玲玲(1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 职业危害因素研究, E-mail: 1536599129@qq.com

通讯作者简介: 漆光紫(1974-), 男, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 疾病防治及卫生服务研究, E-mail: 1603191273@qq.com

staining was adopted to observe the number of Nissl bodies in the hippocampus of mice. **Results** Compared with the WT control group, the WT aluminum exposure group, the HO control group, and the HO aluminum exposure group had significantly decreased mRNA and protein expressions of Nrf2, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the HO control group, the HO aluminum exposure group had no obvious change in the mRNA and protein expression of Nrf2 and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with those of the WT control group, the hippocampal neurons of the WT aluminum exposure group showed karyopyknosis, discrete neurons arrangement, irregular morphology of Nissl bodies and other pathological changes. Compared with the WT aluminum exposure group, the HO aluminum exposure group had more obvious pathological changes in hippocampal neurons. There were a large number of neurons with unclear boundaries, unclear cytoplasmic morphology, reduced number of Nissl bodies, abnormal morphology and irregular boundaries in the HO aluminum exposure group. **Conclusion** Aluminum exposure leads to pathological damage in the hippocampus of mice, and Nrf2 knock-out aggravates aluminium-induced neurotoxicity.

Key words: aluminum; neurotoxicity; oxidative stress; Nrf2

铝(Aluminum, Al)是自然界中含量最丰富的金属元素,且被广泛应用于人类的工农业生产和日常生活。正常情况下,铝在生物体内含量很少,但长期慢性的铝摄入可致体内铝蓄积。研究表明^[1],铝暴露与阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏病、多发性硬化等多种神经系统疾病有关。铝暴露可以导致 A β 异常蓄积^[2-3], A β 的异常蓄积会导致体内活性氧增加,发生氧化应激损伤^[4],大脑极易受到氧化应激的影响^[5],从而引起线粒体损伤及脂质过氧化,甚至导致细胞凋亡或坏死,最终发展成为 AD。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是机体内重要的抗氧化应激调节因子。体内活性氧的增加会激活 Nrf2,激活下游通路发挥其抗氧化应激作用^[6]。而研究表明在 AD 模型中 Nrf2 表达受到抑制^[7],而 Nrf2 信号通路在铝暴露诱导的神经毒性的抗氧化作用及其机制研究还不清楚。本研究主要通过敲除 Nrf2,探讨 Nrf2 在铝诱导海马神经元损伤的作用,为进一步探讨铝致海马神经毒性机制提供科学思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 乳酸铝(美国 Sigma 公司); Nissl 染色试剂盒(中国 Beyotime 公司);兔抗小鼠 Nrf2 抗体(美国 proteintech 公司, CAS: 16396-1-AP);抗山羊抗体 IgG(中国 Beyotime 公司), Morris 水迷宫,显微成像系统。

1.2 实验动物 取 8 周龄 Wild-Type(以下简称 WT)和 Nrf2^{-/-}(以下简称 HO)的 FVB 小鼠[购自南京大学-南京生物医药研究院,动物生产许可证号为 SCXK(苏)2015-0001],各 20 只,饲养于广州市疾病预防控制中心的 SPF 环境中,温度(22 \pm 2)℃,湿度(50 \pm 15)%,光照/黑暗周期为 12 h(07:00~19:00)。垫

料饮水均经过高压灭菌处理,小鼠实验期间自由饮水摄食。实验前适应性饲养 1 周,按体重将 WT 组和 HO 组小鼠各随机分为对照组和铝暴露组,每组 10 只。然后对铝暴露组小鼠采用 220 mg/kg(0.73 mmol/kg)乳酸铝灌胃^[8],对照组采用蒸馏水灌胃,灌胃染毒时间为 3 个月。

1.3 动物取材处理 染毒结束后,各组小鼠用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,行腹腔静脉采血;然后行冰上迅速取脑,一半脑组织用 4%多聚甲醛固定,用于后续 HE 染色、Nissl 染色和免疫组化,一半脑组织用于分离海马,海马用液氮速冻,-80℃保存,用于蛋白和 RNA 检测。

1.4 Nrf2 mRNA 的表达含量测定 采用 Trizol 法提取各组小鼠海马总 RNA。按照试剂盒说明书的程序,用 1 μ g RNA 反转录成模板 cDNA。以 β -actin 作为内部参照,采用实时荧光定量 PCR 检测 Nrf2 mRNA 表达水平,具体程序为 95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火/延伸 30 s,扩增 40 个循环,目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。引物序列见表 1。每组 4 只,共重复 4 次。

表 1 q-PCR 引物序列

引物名称	序列 5'-3'引物	长度/bp
Nrf2	正向:5'-CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA-3'	25
Nrf2	反向:5'-GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT-3'	22
β -actin	正向:5'-GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA-3'	22
β -actin	反向:5'-CACACGCAGCTCATTGTAGA-3'	20

1.5 Nrf2 蛋白的表达含量测定 取脑组织用 4%多聚甲醛固定 24 h 以上,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,使用切片机切片,二甲苯和梯度酒精脱蜡,然后 3%的 H₂O₂ 室温孵育 5~10 min 灭活内源性酶,柠

柠檬酸缓冲液微波炉加热煮沸后冷却至室温, PBS 清洗两次, 10% 血清封闭, 兔抗小鼠 Nrf2 抗体 (1 : 50), 4 °C 孵育过夜, 用 PBS 清洗 3 次, 加山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, DAB 显色, 苏木素染核, 脱水透明, 中性树胶封片并观察。用 Image J 软件分析图片的平均光密度值, 将对照均化为 1, 统计分析 Nrf2 的蛋白相对表达含量。

1.6 小鼠海马区病理变化的观察 脑组织石蜡切片用二甲苯和梯度酒精脱蜡, 水洗, 用苏木素染色 5 min, 然后 1% 盐酸酒精分化, 用返蓝液返蓝, 在伊红染液中染色 3 min, 梯度酒精与二甲苯脱水, 中性树胶封片, 镜下观察海马区病理变化。

1.7 小鼠海马区尼氏小体变化的观察 石蜡切片二甲苯和梯度酒精脱蜡, 水洗, 置于 37 °C 温箱内 Nissl 试剂染色 30 min, 水洗, 95% 酒精分化 5 s, 梯度酒精与二甲苯脱水, 最后使用中性树胶封片。在光学显微镜下观察海马区尼氏形态。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 one-way ANOVA 单因素方差分析比较, 多个样本均数的两两比较采用 LSD 方法比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

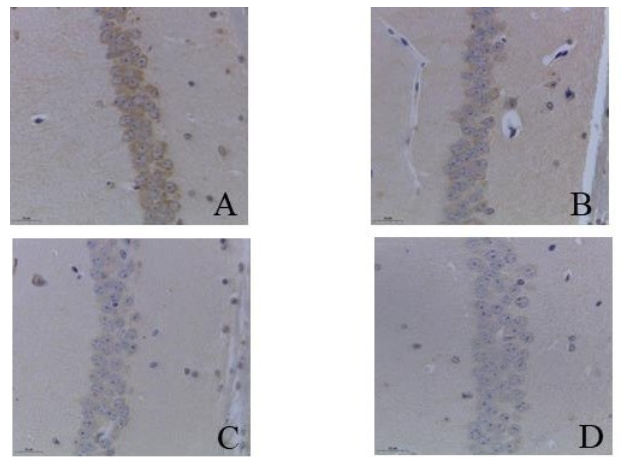
2.1 各组小鼠 Nrf2 mRNA 表达情况 q-PCR 结果显示 4 组小鼠 Nrf2 mRNA 表达含量差异有统计学意义 ($F = 160.596, P < 0.001$), 提示 4 组小鼠 Nrf2 mRNA 表达含量不完全相同。经两两比较, 发现与 WT 对照组相比, WT 铝暴露组、HO 对照组、HO 铝暴露组的 Nrf2 mRNA 表达量均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示铝暴露和 Nrf2 敲除均可下调小鼠的 Nrf2 mRNA 表达。但与 HO 对照组相比, HO 铝暴露组的 Nrf2 mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 Nrf2 敲除小鼠 Nrf2 mRNA 表达量处于较低水平, 且铝暴露不会影响敲除 Nrf2 后小鼠 Nrf2 mRNA 表达量的改变。见表 2。

表 2 各组小鼠 Nrf2 mRNA 表达含量

分组	n	Nrf2 相对表达量
WT 对照组	4	1.00 ± 0.10
WT 铝暴露组	4	0.65 ± 0.12 ^a
HO 对照组	4	0.02 ± 0.03 ^a
HO 铝暴露组	4	0.01 ± 0.005 ^a
F		160.596
P		< 0.001

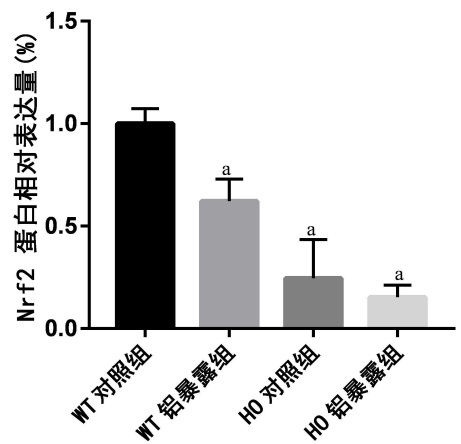
注: ①表内计量资料数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示; ②与 WT 对照组相比, a: $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠海马区 Nrf2 的蛋白表达情况 免疫组化结果显示 4 组小鼠 Nrf2 蛋白表达含量差异有统计学意义 ($F = 55.348, P < 0.001$), 提示 4 组小鼠 Nrf2 蛋白表达含量不完全相同。经两两比较, 发现与 WT 对照组相比, WT 铝暴露组、HO 对照组、HO 铝暴露组的 Nrf2 蛋白表达量均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示铝暴露和 Nrf2 敲除均可下调小鼠的 Nrf2 蛋白表达。但与 HO 对照组相比, HO 铝暴露组的 Nrf2 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 Nrf2 敲除后小鼠的 Nrf2 蛋白表达量处于较低水平, 且铝暴露不会影响 Nrf2 敲除小鼠 Nrf2 蛋白表达量的改变。见图 1、图 2。



注: A. WT 对照组; B. WT 铝暴露组; C. HO 对照组; D. HO 铝暴露组。

图 1 各组小鼠海马区 Nrf2 表达量的变化(免疫组化, ×400)

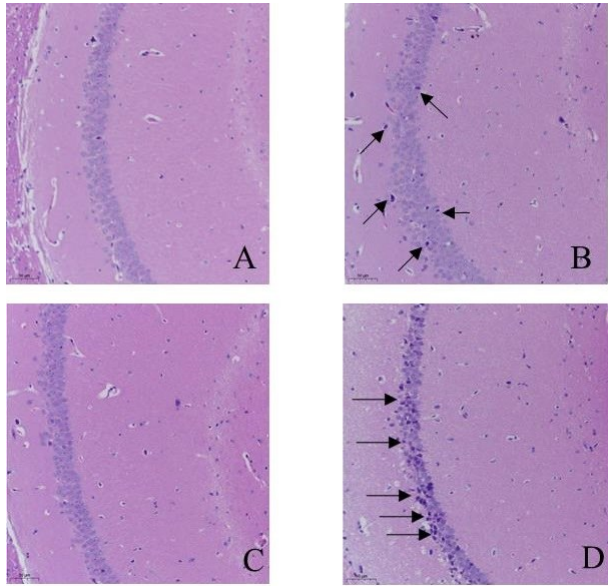


注: a 表示与 WT 对照组相比, $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠海马区 Nrf2 表达量的变化 ($n = 3$)

2.3 各组小鼠海马区病理变化 与 WT 对照组相比, WT 铝暴露组有少量细胞出现核固缩, 胞体变小, 提示铝暴露可以导致小鼠海马区神经元细胞发生病理

损伤;与 WT 对照组相比,HO 对照组神经元排列整齐,未出现损伤,提示 Nrf2 敲除不会损伤小鼠的海马神经元;与 HO 对照组相比,HO 铝暴露组有大量海马神经元出现明显的形态不规则,核固缩,胞体变小,胞浆变少。与 WT 铝暴露组相比,HO 铝暴露组海马神经元病理损伤更为明显,提示 Nrf2 敲除会加重铝诱导的海马神经元损伤。见图 3。



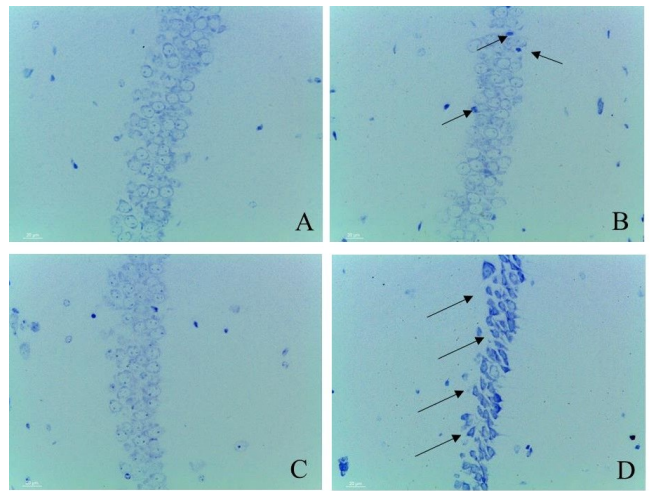
注:A. WT 对照组; B. WT 铝暴露组;
C. HO 对照组; D. HO 铝暴露组。

图 3 各组小鼠海马形态学的变化(HE 染色,×200)

2.4 Nissl 染色检测小鼠海马神经元尼氏小体形态
与 WT 对照组相比,WT 铝暴露组无明显尼氏小体数量减少,仅有少量尼氏小体染色深染,形状不规则,提示铝暴露可以导致小鼠海马区神经元尼氏小体发生损伤;与 WT 对照组相比,HO 对照组尼氏小体数量与形态无明显改变,提示 Nrf2 敲除不会损伤小鼠的海马神经元尼氏小体形态;与 HO 对照组相比,HO 铝暴露组的尼氏小体出现明显的形态不规则,轮廓和边界不清;与 WT 铝暴露组相比,HO 铝暴露组尼氏小体数量明显减少,大部分尼氏小体形态不规则,排列疏散,着色变深,提示 Nrf2 敲除会加重铝诱导的海马神经元损伤。见图 4。

3 讨论

铝作为日常生活中常见的暴露物被认为是各种神经系统疾病和神经退行性疾病的病理因素之一^[9]。研究表明,长期职业铝暴露会出现轻度认知障碍,导致神经元功能受损^[10]。流行病学研究结果显示,AD 患者的脑中有一定程度的铝蓄积^[11]。也有动物实验表明,亚慢性铝暴露会导致神经元发生凋亡和坏死^[10,12],体外也有研究表明,铝暴露会导致神经细胞发生细胞周



注:A. WT 对照组; B. WT 铝暴露组;
C. HO 对照组; D. HO 铝暴露组。

图 4 各组小鼠海马尼氏小体的变化(Nissl 染色,×400)

期停滞,导致神经细胞发生凋亡^[13]。但其中的作用机制尚不明确。

本研究对小鼠灌胃 3 个月后,病理观察到小鼠海马区有神经元出现核固缩,胞体变小和尼氏小体形态改变,结果提示铝暴露导致小鼠神经元细胞坏死或凋亡,而神经元坏死与凋亡是导致认知障碍的关键原因,由此提示铝暴露有可能会通过损伤海马神经元进而影响其学习认知功能。神经元细胞内活性氧激活是导致细胞坏死与凋亡的重要原因,研究表明,铝暴露会导致大脑活性氧增加,破坏体内抗氧化系统平衡,导致细胞发生凋亡,使神经元发生不可逆性损伤^[14],最终导致 AD 发生^[15]。Nrf2 是目前已知的体内重要的抗氧化应激通路,研究已证实其可调控大脑多种生理功能,例如氧化应激^[16]、线粒体损伤^[17]、自噬和凋亡等^[18]。正常情况下,Nrf2 与细胞质中的 Keap1 结合,处于失活状态,当机体发生氧化应激时,活性氧增多会激活 Nrf2,活化后的 Nrf2 进入到细胞核与 ARE 结合,激活一系列下游通路发挥保护作用。本研究中通过铝染毒 3 个月观察到,与对照组相比,染毒组小鼠海马组织中 Nrf2 表达明显降低,结果进一步提示铝可能通过激活活性氧导致神经细胞凋亡或坏死,这与前人的研究基本一致^[19],而 Nrf2 可能在其中具有重要作用。因此,本研究进一步采用 Nrf2 敲除小鼠模型来探讨 Nrf2 在铝诱导神经损伤中的作用,结果发现,Nrf2 敲除后小鼠较未敲除小鼠相比铝暴露小鼠出现更明显的海马神经元病理改变,尼氏小体形态异常,数量减少,神经元活性明显下降。结果进一步证实铝通过抑制 Nrf2 表达导致神经元损伤,进而导致认知障碍。其可能是通过降低 Nrf2 的稳定性,使其泛素化水平升高,从而降低 Nrf2 的表达^[20]。

综上,铝染毒 3 个月可导致小鼠海马神经元凋亡与坏死,主要是通过抑制海马组织中 Nrf2 表达,导致细胞内氧化应激激活所致,但其具体作用机制待进一步分析。

参考文献:

- [1] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9:124.
- [2] Walton JR, Wang MX. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease [J]. *J Inorg Biochem*, 2009, 103(11):1548-1554.
- [3] Sakamoto T, Saito H, Ishii K, et al. Aluminum inhibits proteolytic degradation of amyloid beta peptide by cathepsin D: a potential link between aluminum accumulation and neuritic plaque deposition [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(28-29):6543-6549.
- [4] Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease; where are we now? [J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 119(6):598-620.
- [5] Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(12):548-554.
- [6] Buendia I, Michalska P, Navarro E, et al. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157:84-104.
- [7] Yi S, Chen S, Xiang J, et al. Genistein exerts a cell-protective effect via Nrf2/HO1/PI3K signaling in Ab25-35-induced Alzheimer's disease models in vitro [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2021, 59(1):49-56.
- [8] Zhang H, Wei M, Lu X, et al. Aluminum trichloride caused hippocampal neural cells death and subsequent depression-like behavior in rats via the activation of IL-1 β /JNK signaling pathway [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 715:136942.
- [9] Mustafa Rizvi SH, Parveen A, Verma AK, et al. Aluminum induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e98409.
- [10] Zawilla NH, Taha FM, Kishk NA, et al. Occupational exposure to aluminum and its amyloidogenic link with cognitive functions [J]. *J Inorg Biochem*, 2014, 139:57-64.
- [11] Lukiw WJ, Kruck TPA, Percy ME, et al. Aluminum in neurological disease - a 36 year multicenter study [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 8(6):457.
- [12] 庞雅琴, 韦雨露, 李卓昕, 等. 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 [J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(5):341-344.
- [13] 韦俊宏, 韦雨琪, 黄与实, 等. 莱菔硫烷对 AlCl₃ 诱导 SH-SY5Y 细胞周期和细胞凋亡抑制作用研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(6):679-684.
- [14] Myhre O, Utkilen H, Duale N, et al. Metal dyshomeostasis and inflammation in Alzheimer's and Parkinson's diseases: possible impact of environmental exposures [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:726954.
- [15] Singh S, Gupta SK, Seth PK. Biomarkers for detection, prognosis and therapeutic assessment of neurological disorders [J]. *Rev Neurosci*, 2018, 29(7):771-789.
- [16] Liu Z, Han K, Huo X, et al. Nrf2 knockout dysregulates iron metabolism and increases the hemolysis through ROS in aging mice [J]. *Life Sci*, 2020, 255:117838.
- [17] Anuranjani, Bala M. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - implication in modification of radiation damage [J]. *Redox Biol*, 2014, 2:832-846.
- [18] Ahmed SA, Mohammed WI. Carvedilol induces the anti-apoptotic proteins Nrf₂ and Bcl₂ and inhibits cellular apoptosis in aluminum-induced testicular toxicity in male Wistar rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139:111594.
- [19] Sadek KM, Lebda MA, Abouzed TK. The possible neuroprotective effects of melatonin in aluminum chloride-induced neurotoxicity via antioxidant pathway and Nrf2 signaling apart from metal chelation [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(9):9174-9183.
- [20] 吴卉. 铝暴露对 SH-SY5Y 细胞中 BRCA1 调控 Nrf2 水平及稳定性影响的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.

收稿日期:2022-01-11;修回日期:2022-02-09