

· 论 著 ·

慢性铝负荷致小鼠神经元退行性改变与脑内锰离子关系的研究

邱红梅,何百成,周岐新[△]

(重庆医科大学药学院药理教研室 400016)

摘要:目的 探讨慢性铝负荷致神经元退行性改变的可能机制。方法 选择健康雄性 NIH 小鼠 140 只,随机分为铝负荷组与对照组各 70 只。铝负荷组小鼠每天灌胃给予 45%葡萄糖酸铝(0.2 mL/10 g);对照组小鼠给予等体积蒸馏水灌胃;每周 6 天,连续 12 周。比较两组小鼠学习和记忆功能改变、海马病理学改变、大脑皮层和海马金属锰离子含量变化。结果 铝负荷组小鼠从第 4 周开始被动学习记忆和空间识别能力显著降低;病理学检查显示海马神经元出现明显核固缩和丢失;第 6 周开始皮层和海马的锰离子含量显著增高。结论 慢性铝负荷可导致小鼠神经元退行性改变,学习记忆能力下降,其机制可能与铝负荷引起脑内锰等金属离子代谢紊乱有关。

关键词:铝;锰;神经元退行性改变;铝负荷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)14-1358-03

Study on relationship between manganese level and neurodegeneration induced by chronic aluminum overload in mice

Qiu Hongmei, He Baicheng, Zhou Qixin[△]

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible mechanism of neurodegeneration caused by chronic aluminum overload in mice. **Methods** 140 healthy male NIH mice were selected and randomly divided into the aluminum overload group and the control group, 70 cases in each group. 45% aluminum gluconate solution(0.2 mL/10 g) was given by intragastric gavage in the aluminum overload group, once a day, 6 d per week for 12 weeks. The control group was given isovolumetric distilled water. The learning and memory functions, histopathological changes of hippocampus, as well as the concentrations of manganese in hippocampus and cerebra were compared between the two groups. **Results** Both functions of passive learning and memory and spatial recognition were significantly decreased from 4 weeks. Hippocampal neurocytes showed pyknosis and lost, as well as the manganese level was significantly increased from 6 weeks in time-dependent manner. **Conclusion** Chronic aluminum overload can cause neurodegeneration and learning and memory dysfunction in mice obviously, its mechanism may be related with the aluminum-induced metabolic disturbance of intracerebral manganese metal ions.

Key words: aluminum; manganese; neurodegeneration; aluminum overloading

铝是一种可使神经系统发生退行性改变的慢性神经毒性物质,可引起学习记忆及认知能力障碍,其机制涉及氧化应激、线粒体损伤等^[1-2]。有研究证明,脑内微量注射氯化铝可导致小鼠神经退行性改变,氧化应激损伤显著,出现学习记忆功能障碍,海马神经元核碎裂、固缩、神经元丢失^[3-4],但慢性铝中毒是否能产生类似的神经元退行性改变,脑内金属离子紊乱是否与之相关,尚缺乏系统研究。因此,本研究采用经胃肠道给药致小鼠慢性铝中毒模型,观察其神经元退行性改变与脑内金属锰离子的关系,从而探讨铝负荷致神经退行性改变的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 选择健康雄性 NIH 小鼠 140 只[重庆医科大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(渝)20020001],体质量 20~25 g,4 周龄。随机分为铝负荷组与对照组各 70 只。葡萄糖酸钠与 AlCl₃·6H₂O 临用前用蒸馏水配成 45%葡萄糖酸铝溶液。铝负荷组每天灌胃给予 45%葡萄糖酸铝 0.2 mL/10 g(相当于 Al³⁺ 400 mg/kg);对照组给予等体积蒸馏水,每周 6 天,连续 12 周。

1.2 试剂与仪器 葡萄糖酸钠、AlCl₃·6H₂O、25%四乙基

氢氧化铵均为国产分析纯。SIZ-2 型电脑全自动程控 Morris 水迷宫、小鼠 light-dark 明暗刺激仪由中国医学科学院药物研究所研制;等离子体原子发射光谱分光光度仪 Plasma400 购自美国 PE 公司。

1.3 模型制备 于给药后的 1、2、3、4、6、8、12 周 7 个时间点测定小鼠学习记忆功能、观察海马病理形态学变化、测定皮层和海马金属铝离子、锰离子。

1.4 小鼠避暗实验 各组取小鼠 10 只,头部向外放入明室中,暗室底部通电(36 V, AC),记录 5 min 内小鼠由明室进入暗室遭受电击所需的时间间隔(潜伏期)以及遭受电击的次数(错误次数)。24 h 以后,重复上述操作。

1.5 小鼠 Morris 水迷宫实验 各组取小鼠 10 只进行测试。水迷宫内水恒温 24~25 °C,测定时间为 5 min。实验分为训练阶段和测试阶段。训练阶段:持续训练 4 d,上、下午分段训练,每次选择 4 个不同的入水点,将小鼠面向池壁放入水池并定向航行至平台。测试阶段:第 5 天进行,测试时撤去平台,将小鼠任意方位放入水池,记录小鼠第 1 次航行至原平台的时间(寻台时间),超过 5 min 以 5 min 计算。

1.6 脑皮层和海马金属离子测定 各组取小鼠 5 只,断头处

[△] 通讯作者, Tel:(023)68485038; E-mail:cqzhouqx@yahoo.com.cn.

死,分离皮层和海马并称质量,匀浆后加入 25%四乙基氢氧化铵(8 mL/g),80 °C 恒温消化至溶液澄清,然后加双蒸水定容至 10 mL,采用 Plasma 400 等离子体原子发射光谱分光光度计进行测定。铝测定波长为 309.3 nm,锰测定波长为 257.6 nm。

1.7 在体固定及切片制备 4%水合氯醛腹腔麻醉小鼠,仰卧位固定,剪开胸腔、剥离心包,用头皮针从左心室滴注含 5%甲醛和肝素的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)固定,与此同时剪碎肝脏作为灌注液及血液的流出口,待小鼠身体僵硬后断头分离脑组织,保存于固定液中,2~7 d 后行冠状切面切片,HE 染色后显微镜镜检。

1.8 统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,采用 SAS6.12 软件进行逐步回归检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 铝负荷对小鼠避暗行为的影响 小鼠避暗实验可见,与对照组小鼠相比,铝负荷组小鼠潜伏期从 4 周开始呈时间依赖性明显缩短,而受电刺激错误次数明显增多($P < 0.05$),见表 1。

表 1 铝负荷对小鼠避暗行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间	潜伏期(s)		错误次数(n)	
	铝负荷组	对照组	铝负荷组	对照组
1 周	273.9 ± 29.6	275.2 ± 30.1	1.3 ± 1.0	1.1 ± 0.8
2 周	243.4 ± 86.1	273.1 ± 44.4	1.1 ± 0.8	1.0 ± 0.8
3 周	235.8 ± 50.2	266.0 ± 12.9	1.3 ± 1.0	1.1 ± 1.0
4 周	176.3 ± 23.4*	230.0 ± 35.6	2.1 ± 0.8*	0.9 ± 0.8
6 周	78.0 ± 22.2*	270.5 ± 37.2	2.3 ± 1.0*	1.0 ± 0.8
8 周	48.8 ± 17.1*	265.6 ± 29.6	3.0 ± 1.1*	0.9 ± 0.8
12 周	19.5 ± 12.4*	286.4 ± 24.5	3.9 ± 1.0*	0.9 ± 0.8

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 铝负荷对小鼠 Morris 水迷宫寻台时间的影响 小鼠水迷宫实验显示,与对照组小鼠相比,铝负荷组小鼠从 4 周开始寻台时间显著延长($P < 0.05$),见表 2。

表 2 铝负荷对小鼠水迷宫寻台时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间	铝负荷组	对照组
1 周	19.0 ± 12.2	21.4 ± 13.8
2 周	21.4 ± 9.2	20.8 ± 9.5
3 周	21.0 ± 41.6	19.2 ± 7.2
4 周	41.6 ± 14.7*	23.2 ± 6.7
6 周	90.4 ± 8.8*	22.2 ± 4.5
8 周	153.2 ± 13.3*	24.8 ± 6.1
12 周	149.0 ± 16.5**	22.4 ± 8.6

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 铝负荷对小鼠海马病理形态学的影响 脑组织 HE 染色后,镜检可见,对照组小鼠各时间点海马神经元层次分明,排列紧密,形态清晰;铝负荷组神经元从 6 周开始随铝负荷时间的延长出现海马神经元层次不清、细胞形态改变、核固缩,碎裂和

细胞缺失(封 2 图 1)。

2.4 铝负荷对小鼠脑组织金属离子含量的影响 与对照组小鼠相比,铝负荷组小鼠从 6 周开始,皮层和海马 Al、Mn 离子含量的增加呈显著时间依赖性($P < 0.05$),见表 3~4。

表 3 铝负荷对小鼠脑组织铝离子含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

时间	皮层铝离子($\mu\text{mol/L}$)		海马铝离子($\mu\text{mol/L}$)	
	铝负荷组	对照组	铝负荷组	对照组
1 周	30.37 ± 8.37	35.27 ± 15.64	139.14 ± 13.26	142.54 ± 25.87
2 周	34.87 ± 18.86	32.25 ± 12.91	143.76 ± 27.14	141.77 ± 17.75
3 周	32.99 ± 5.14	31.07 ± 9.25	155.9 ± 27.78	132.87 ± 33.90
4 周	51.57 ± 7.38	40.54 ± 15.78	145.82 ± 49.70	128.79 ± 13.26
6 周	67.41 ± 6.34*	41.23 ± 12.53	212.56 ± 26.00*	124.13 ± 28.54
8 周	84.99 ± 6.25*	42.73 ± 13.13	197.02 ± 17.32*	136.53 ± 28.29
12 周	70.87 ± 9.98*	43.63 ± 8.03	186.84 ± 20.33*	137.83 ± 16.10

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 4 铝负荷对小鼠脑组织锰离子含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5, \mu\text{mol/L}$)

时间	皮层铝离子		锰离子	
	铝负荷组	对照组	铝负荷组	对照组
1 周	2.77 ± 0.53	3.02 ± 0.33	16.26 ± 6.2	15.49 ± 3.12
2 周	2.30 ± 0.30	3.59 ± 1.45	16.34 ± 4.74	14.25 ± 5.56
3 周	3.07 ± 0.44	2.46 ± 1.72	16.85 ± 4.68	15.59 ± 8.46
4 周	4.47 ± 0.59*	2.73 ± 0.62	19.94 ± 6.71*	14.01 ± 4.25
6 周	5.67 ± 0.81**	2.71 ± 0.90	24.54 ± 2.92*	15.26 ± 3.59
8 周	8.43 ± 0.58**	3.69 ± 0.88	25.18 ± 0.82**	14.92 ± 3.02
12 周	7.93 ± 1.22*	3.06 ± 1.20	24.16 ± 1.29*	15.73 ± 4.72

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.5 小鼠学习记忆损伤与脑内锰离子水平的逐步回归模型分析 皮层的锰离子水平增高对小鼠 Morris 水迷宫寻台时间延长有显著影响($P < 0.05$),皮层锰离子的标准偏回归系数(Bj)为 35.36,标准误为 6.47, $F = 29.88, P = 0.0054$ 。

3 讨 论

目前,随着老龄化社会的到来,越来越多的老龄化疾病受到重视,其中神经退行性疾病备受关注。神经系统退行性疾病是一类与年龄呈正相关、慢性进行性神经系统疾病,包括阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、帕金森病(Parkinson's diseases, PD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等。这些神经系统退行性疾病的病因、病变部位可各不相同,但在中枢神经系统中均有某些特定区域的神经元损伤甚至死亡。目前,神经退行性疾病的发病机制尚不十分明确。铝是地壳中含量最丰富的金属元素之一,也是日常生活中人们经常接触的元素,其具有显著的神经毒性。小鼠脑室内微量注入氯化铝及自由摄入含铝离子之水均可导致神经系统退行性改变和神经系统炎症的发生^[3-4]。自然条件下长期饮用或食用铝含量过高的水或食物可导致慢性铝中毒,所以本研究采用持续 12 周给予

葡萄糖酸铝致慢性铝中毒模型,以研究其对脑学习记忆功能、海马病理形态学以及金属锰离子含量的影响。研究结果显示,葡萄糖酸铝溶液持续灌胃 12 周,铝负荷组小鼠被动学习记忆能力进行性减弱,空间识别定位能力进行性降低;海马区神经元核碎裂、变性、固缩、缺失呈时间依赖性加重。上述结果提示,葡萄糖酸铝灌胃 12 周致神经元退行性改变模型建立成功。

脑内金属离子紊乱与神经系统退行性疾病的发生、发展密切相关^[5-6]。国内外研究报道均显示,在多种铝负荷致神经退行性改变模型都出现脑内锰、铜、铁等金属离子紊乱^[3,7]。锰、铜、铁等过渡金属元素在氧化还原反应中具有特殊的电子传递作用,而同时会伴有自由基(如超氧阴离子)的生成。生理状态下这些生成的自由基可被机体相应的抗氧化应激系统清除(如超氧化物歧化酶),但病理状态下则可经 Fenton、Haber-Weiss 反应生成毒性更大的羟自由基,当超过机体的最大清除能力时就可导致蛋白质、核酸、膜脂质氧化,继而发生神经元退行性改变直至神经元死亡^[8]。

锰是人体营养代谢过程中必需的微量元素之一,是许多代谢酶的重要组成成分,如精氨酸酶。但研究显示过量的锰也可导致显著的神经毒性^[9-12]。高锰环境可导致神经系统退行性疾病发生的概率显著增加^[13];长期接触锰及其含锰的无机毒物如杀虫剂与特发性老年帕金森病之间存在正相关^[14-15],这提示神经系统退行性疾病的发生可能与脑内锰离子的代谢紊乱有关。本研究结果显示,铝负荷组小鼠海马及皮质锰离子含量的增加从 6 周开始出现显著时间依赖性,而对照组小鼠无显著改变。这是否提示在铝负荷致神经系统退行性改变的过程中,皮质和海马锰离子含量增高是导致学习记忆功能障碍的原因之一?于是,本研究将铝负荷组小鼠皮质和海马锰离子含量与水迷宫寻台时间、避暗实验潜伏期做了多元逐步回归模型分析,结果显示铝负荷致神经退行性变过程中,锰离子含量的增高对铝负荷组小鼠的学习记忆功能障碍具有显著影响。这提示脑内锰离子水平的增高在神经元退行性变过程中也发挥了重要的作用,但其具体机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. *Nat Rev Drug Discover*, 2004, 3(3):205-214.
- [2] Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival[J]. *J Neurochem*, 2009, 109(Suppl 1):S133-138.
- [3] 何百成,滕永真,杨俊卿,等. 黄连总生物碱对铝致神经元退变的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(6):800-804.
- [4] 何百成,滕永真,杨俊卿,等. 铝过负荷致小鼠脑神经元退变与脑铁代谢失衡的关系[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006, 20(1):66-70.
- [5] Molina-Holgado F, Hider RC, Gaeta A, et al. Metals ions and neurodegeneration[J]. *Biometals*, 2007, 20(3/4):639-654.
- [6] Shcherbatykh I, Carpenter DO. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2007, 11(2):191-205.
- [7] Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Balietti M, et al. Chronic aluminium administration to old rats results in increased levels of brain metal iron and enlarged hippocampal mossy fibers[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1019:44-47.
- [8] Hamai D, Bondy SC, Becaria A, et al. The chemistry of transition metals in relation to their potential role in neurodegenerative processes[J]. *Curr Top Med Chem*, 2001, 1(6):541-551.
- [9] Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, et al. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 240(2):219-225.
- [10] Milatovic D, Yin Z, Gupta RC, et al. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 98(1):198-205.
- [11] Tong M, Dong M, de la Monte SM. Brain insulin-like growth factor and neurotrophin resistance in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: potential role of manganese neurotoxicity[J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 16(3):585-599.
- [12] Zhang P, Hatter A, Liu B. Manganese chloride stimulates rat microglia to release hydrogen peroxide[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 173(2):88-100.
- [13] Halatek T, Walczak HS, Szymczak M, et al. Neurological and respiratory symptoms in shipyard welders exposed to manganese[J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 2005, 18(3):265-274.
- [14] Benedetto A, Au C, Aschner M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease[J]. *Chem Rev*, 2009, 109(10):4862-4884.
- [15] Prabhakara K, Ghosh D, Chapman GD, et al. Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity[J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76(4):361-367.

(收稿日期:2012-01-15 修回日期:2012-03-01)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。