论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1028-04

慢性铝过负荷致大鼠认知功能损伤及尼莫地平保护作用观察

肖小华[1],张 静[2],杨俊卿[2] (重庆医科大学:[1]护理系药理学教研室;[2]药学院药理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 观察铝过负荷对大鼠的神经毒性及尼莫地平的保护作用。**方法** 大鼠灌胃给予葡萄糖酸铝(Al^{3+} 400 mg/kg),1次/d,1周5 d,持续12周,建立慢性铝负荷致大鼠脑损伤、神经元退变模型。观察指标包括行为学(跳台法测定被动回避性学习记忆能力、水迷宫测定空间定向能力)、组织病理学、生化酶学(MAO-B、ChAT、AchE和SOD活性,MDA含量)等,尼莫地平(80 mg/kg)或者生理盐水在给予铝盐后4 h灌胃给予。**结果** 与对照组相比,慢性铝过负荷明显导致大鼠被动回避性学习记忆能力和空间定向能力障碍、大鼠海马神经元明显核固缩和数目减少;海马ChAT、SOD活性明显降低,AchE、MAO-B活性、MDA含量明显升高;尼莫地平给予能明显改善铝负荷大鼠的学习记忆能力损害和海马神经元损伤。**结论** 铝过负荷致大鼠脑损伤、学习记忆能力障碍可能涉及细胞内钙超载、氧化应激损伤以及MAO-B活性改变;尼莫地平对慢性铝负荷的神经毒性有明显的保护作用。

关键词: 慢性铝过负荷;认知功能损伤;MAO-B;氧化应激;尼莫地平

中图法分类号: R155.33; R338.64; R972 **文献标识码:** A

Neurotoxicity of chronic aluminum overload and protective effects of nimodipine in rats

XIAO Xiao-hua[1], ZHANG Jing[2], YANG Jun-qing[2] ([1]Department of Pharmacology of Nursing Faculty, [2]Department of Pharmacology of College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the neurotoxicity of chronic aluminum overload and the protective effects of nimodipine in rats. Methods The brain damage models of rats were established *via* intragastric administration of aluminum gluconate(element aluminum 400 mg/kg) once a day, 5 d/week for 12 weeks. The step-down test and programmed Morris water maze test were used to evaluate the changes of learning and memory functions of rats. Pathomorphological changes of hippocampi of rats were observed. The activities of SOD, ChAT, AchE, MAO-B and the contents of MDA of brain tissue in rats were also measured. Nimodipine (80 mg/kg) were intragastrically administered 4 h after aluminum administration every time for 12 weeks. Results Chronic aluminum administration induced the impairment of avoidance learning and memory ability and spatial oriental ability. Consistent with the behavioral changes, neuronal death in the hippocampi, decreased activities of SOD and ChAT, increased content of MDA, and increased activity of MAO-B and AchE were detected in the aluminum-overload mice. The administration of nimodipine could significantly protect rats from the brain damage, and behavioral and biochemical changes above caused by aluminum overload were in a dose-dependent manner. Conclusion These results suggest that changes of cellular calcium overload and oxide stress and MAO-B activities are involved in pathophysiological mechanisms of brain injury induced by chronic aluminum overload. Nimodipine has a protective effect on neurotoxicity of chronic aluminum overload.

Key words: chronic aluminum overload; cerebral damage; MAO-B; oxide stress; nimodipine

人口老龄化是全世界面临的一大难题,就中国而言,一些大城市已步入老龄化阶段。深入研究神经元退变的发病机制和开发有效的防治药物已成为老年医学、神经病学和神经药理学重要课题。研究表明,用转基因方法建立阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的大鼠模型能较好的模拟AD特征改变,但动物建模时间长,成本昂贵,很难广泛用于研究[1]。动物脑室注射、腹腔给予或者长期口服铝盐,铝可在脑皮层各区以及海马异常沉积,引起动物或人学习记忆功能的进行性损害和神经元退变[2-4]。从事铝焊接作业工人记忆力、学习能力和注意力明显下降,与铝接触量成正相关[5]。除职业性暴露和临床治疗用药外,正常人摄入

基金项目: 重庆市科委自然科学基金(2004-27-78)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004-27-78)

作者简介: 肖小华(1963-),女,四川省岳池县人,主管药师,主要从事临床药理方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)66679359

通讯作者: 杨俊卿,E-mail:cqjqyang2004@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-10-10;**修回日期:** 2006-12-02

的铝 95% 来自于食物,而不到 1% 的量来自于空气中粉尘铝[6]。我室建立了脑室给铝致小鼠脑损伤模型,具有造模时间短的优点,但是与临床铝摄入途径有很大差异、并为损伤性的,且其倾向于急性脑损伤,严格意义上还不能称为慢性损伤模型[7]。因此,本研究我们拟采用大鼠慢性灌胃给予铝盐的方法建立大鼠脑损伤、神经元退变模型,并初步观察尼莫地平的保护作用。

1　材料与方法

1.1　动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量 180 ~ 220 g,由本校实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2005002,实验动物使用许可证号:SYXK(渝)2002007。

1.2　药品及试剂

$AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 和葡萄糖酸钠为国产分析纯(生产批号 20021201),称取 17.9 g $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 及 9.9 g 葡萄糖酸钠溶于少量双蒸水中,待溶液清澈后用 0.1 mol/L NaOH 将溶液滴定到 pH 7.0 左右,将双蒸水定容到 100 ml,配制成 Al^{3+} 浓度为 4% 的葡萄糖酸铝溶液。尼莫地平由重庆科瑞制药有限公司馈赠。胆碱乙酰基转移酶(ChAT)、胆碱酯酶(T-chE)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、单胺氧化酶 B(MAO-B)试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。

1.3　主要仪器

DTT-2 型大鼠跳台仪(中国医学科学院药物研究所研制),DMS-2 型电脑全自动程控 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所研制),高速冷冻离心机(Sigma),UV-260 紫外分光光度计(日本)。

1.4　动物分组

取清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只,分成 3 组,每组 20 只,即正常对照组(0.5% 羧甲基纤维素钠),铝负荷型组(Al^{3+} 400 mg/kg),尼莫地平组(Al^{3+} 400 mg/kg + 尼莫地平)。0.5% 羧甲基纤维素钠和铝灌胃,1 周灌胃 5 d,连续 12 周,灌胃体积为 1 ml/100 g;尼莫地平(80 mg/kg)或者生理盐水在每次给予铝盐后 4 h 灌胃。

给予铝 12 周后,进行行为学、组织病理学和生化酶学观察。

1.5　学习记忆功能测定

1.5.1　被动回避实验　　分别在给予药物 12 周后次日,按照文献[8]将每组大鼠用跳台法测定大鼠被动回避性学习记忆能力。先将动物放入反应箱中适应 1 min,然后通以电压为 36 V 的交流电 5 min,大鼠遭受电击会跳上安全平台,而走下平台后会再次遭受电击,记录 5 min 内大鼠受电击次数,作为大鼠学会逃避电击的学习能力。24 h 后测定大鼠的记忆成绩,把大鼠置于安全平台上,记录至大鼠第 1 次跳下平台的时间即潜伏期(latency),以此潜伏期作为大鼠的记忆成绩,超过 5 min 记为 5 min。

1.5.2　空间学习记忆能力测试　　按照文献[9]采用电脑全自动程控 Morris 水迷宫测定大鼠空间学习记忆功能。每组大鼠在完成被动回避性学习记忆能力测试后,用 Morris 水迷宫进行大鼠空间定向能力测试。水温 24 ~ 25 ℃。整个训练过程分为 2 个阶段:第 1 阶段,第 1 次训练时将大鼠放到平台上适应 1 min,后让其自由游泳至平台,3 min 内未找到平台者,实验者协助将其引至平台。从第 2 天起,每天分上、下午分段训练,每段训练 4 次,每次训练时选择 1 个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,让大鼠进行定向航行,持续训练 4 d;第 2 阶段,即在第 5 天时进行测试,撤去平台,并任意将大鼠从最后 1 次训练时的入水方位放入,电脑记录大鼠第 1 次跨越原平台的时间,即寻台潜伏期(exploring time)(超过 3 min 以 3 min 计算)。

1.6　在体灌流固定以及组织病理学观察

在完成空间学习记忆能力测试后,每组取大鼠 3 只,用戊巴比妥(40 mg/kg,腹腔注射)麻醉,用 100 ml 0.9% 生理盐水(含 250 U 肝素)经心脏进行在体灌流,随后用含 3.5% 甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)进行在体脑组织固定。完整分离脑组织,保存在固定液中 2 ~ 7 d。脑组织冠状切面切片,HE 染色镜检。

1.7　生化指标的测定

在完成全部行为学测试后,处死大鼠,分离海马及皮质,用生理盐水做成 10%(质量体积比)的匀浆,以双缩脲法测定样品中蛋白质含量,分别测定海马 AchE、ChAT、SOD 及海马和皮质的 MAO-B 活性以及海马 MDA 含量。测定方法及步骤按照各相应试剂盒说明书要求的操作步骤进行。

1.8　统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 6.12 统计软件采用单因素方差分析,组间比较用 Dennett's t 检验。

2　结果

2.1　铝过负荷对大鼠学习记忆功能的影响

2.1.1　铝过负荷对大鼠被动回避性学习记忆能力的影响　　铝盐灌胃 12 周后,铝过负荷大鼠学会逃避电击所需要的训练次数与正常对照组相比明显增加($P < 0.01$)。对于记忆成绩,铝负荷组大鼠的跳台潜伏期(SDL)明显低于对照组($P < 0.01$)。与铝负荷组相比,尼莫地平组大鼠训练次数明显减少,而 SDL 明显延长($P < 0.01$)(表 1)。

表 1　铝过负荷对大鼠被动回避性学习记忆能力的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

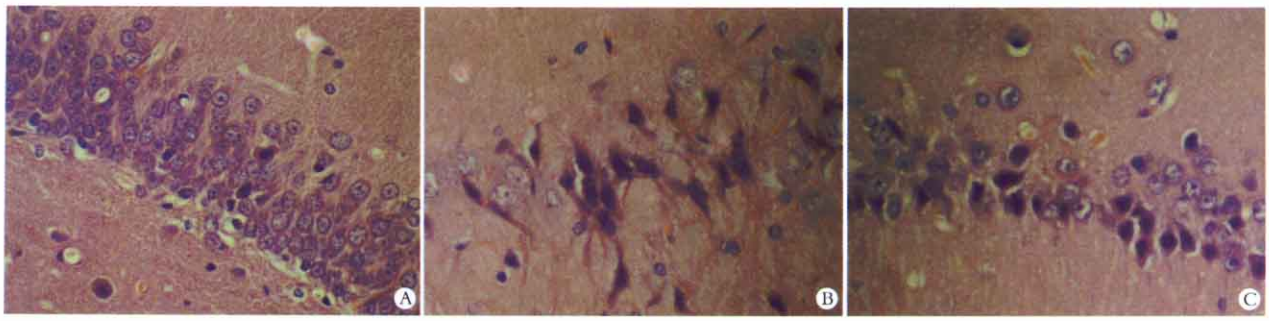
组别	训练次数	SDL(s)
正常对照组	1.25 ± 0.46[a]	299.12 ± 30.00[a]
铝负荷组	5.56 ± 0.31	26.18 ± 16.25
尼莫地平组	2.29 ± 0.48[a]	233.00 ± 13.54[a]

a: $P < 0.01$, 与铝负荷组比较

2.1.2　铝过负荷对大鼠空间学习记忆的影响　　Morris 水迷宫测试结果显示,铝过负荷大鼠寻找安全平台所需的时间明显延长,为(36.13 ± 3.12)s,而对照组仅为(19.75 ± 4.10)s($P < 0.01$);尼莫地平处理组大鼠的寻台潜伏期明显比铝负荷组短,为(23.50 ± 4.63)s($P < 0.01$)。

2.2　铝过负荷对大鼠脑组织病理形态学的影响

正常对照组大鼠海马神经元结构清楚、完整,细胞排列及层次分明,而铝负荷组大鼠海马的神经细胞出现明显核固缩,细胞层次数目明显减少,而尼莫地平给予能使铝负荷大鼠海马神经细胞核固缩减轻(图 1)。



A:正常对照组;B:铝负荷组;C:尼莫地平组

图1 各组大鼠海马病理学变化 (HE×400)

2.3 铝过负荷对大鼠脑组织生化指标的影响

2.3.1 铝过负荷对大鼠海马 AchE 活性的影响 与相应的正常对照组相比,铝负荷组大鼠海马 AchE 活性明显升高($P<0.01$);而尼莫地平组大鼠海马 AchE 活性明显低于铝中毒组($P<0.01$),但是仍然明显高于正常对照组($P<0.01$)(表2)。

2.3.2 铝过负荷对大鼠海马 ChAT 活性的影响 铝负荷组大鼠海马 ChAT 活性也明显低于对照组($P<0.01$),以尼莫地平给予能明显增加铝负荷大鼠海马 ChAT 活性($P<0.01$)(表2)。

表2 铝过负荷对大鼠海马 AchE 和 ChAT 活性的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	AchE	ChAT
正常对照组	0.31±0.02[a]	988.16±90.00[a]
铝负荷组	0.99±0.13	190.02±34.88
尼莫地平组	0.45±0.09[a]	614.98±88.64[a]

a:$P<0.01$,与铝负荷组比较

2.3.3 铝过负荷对大鼠海马 SOD 活性和 MDA 含量的影响 铝负荷大鼠海马 SOD 活性明显低于对照组,而 MDA 含量明显高于对照组($P<0.01$);尼莫地平给予使铝负荷大鼠 SOD 活性明显升高、MDA 含量明显降低($P<0.01$)(表3)。

表3 铝过负荷对大鼠海马 SOD 活性和 MDA 含量的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
正常对照组	39.63±3.57[a]	0.26±0.13[a]
铝负荷组	14.04±2.62	1.93±0.27
尼莫地平组	28.52±2.51[a]	0.77±0.14[a]

a:$P<0.01$,与铝负荷组比较

2.3.4 铝过负荷对大鼠海马及皮质 MAO-B 活性的影响 铝负荷组大鼠海马、皮层 MAO-B 活性比相应对照组明显增高($P<0.01$);尼莫地平给予均能使海马、皮层 MAO-B 活性明显降低,但是均明显高于正常对照组($P<0.01$)(表4)。

表4 铝过负荷对大鼠海马及皮质 MAO-B 活性的影响
(U/mg, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	海马 MAO-B	皮质 MAO-B
正常对照组	0.43±0.09[a]	0.47±0.11[a]
铝负荷组	1.87±0.33	1.73±0.22
尼莫地平组	0.76±0.13[a]	0.84±0.06[a]

a:$P<0.01$,与铝负荷组比较

3 讨论

本研究采用长期灌胃给予葡萄糖酸铝的方法(1周5次,12周),建立神经元退变大鼠模型。结果显示,铝灌胃给予12周后,铝过负荷致大鼠被动回避性学习成绩显著下降,学会逃避电击所需的训练次数明显增加,而被动回避性记忆能力显著受损,SDL 显著缩短;空间学习能力也明显减弱,寻台潜伏期明显延长。在铝负荷大鼠出现行为功能障碍的同时,海马神经元出现明显细胞核固缩、细胞丢失。有研究表明,AD 患者胆碱能神经系统损伤明显,乙酰胆碱递质的含量显著下降,进而造成了患者学习记忆功能的明显障碍。实验研究与临床研究均显示,增加乙酰胆碱的含量能明显改善 AD 患者的认知功能障碍症状。胆碱乙酰基转移酶(ChAT)是胆碱能神经元中合成乙酰胆碱的限速酶,而乙酰胆碱主要在 AchE 催化下分解。ChAT 的表达和活性降低以及 AchE 活性的升高无疑会造成乙酰胆碱递质的含量下降,进而出现学习记忆功能障碍。因此,可以认为 ChAT 和 AchE 表达和活性改变是胆碱能神经元功能变化的标志之一,也是 AD 等神经元退行性疾病特征变化的标志酶之一。在本研究中,我们观察到,正常对照组大鼠脑组织海马神经元 ChAT 活性明显高于铝模型组大鼠 ChAT 活性,而正常对照组大鼠脑组织海马神经元 AchE 活性明显低于铝模型组大鼠 AchE 活性。结合大鼠行为学和组织病理学的变化,我们认为,本研究中长期灌胃给予葡萄糖酸铝,明显损伤大鼠与学习记忆密切相关的胆碱能神经元,因此,可以认为用此方法建立神经元退变大鼠模型是成功的。

关于铝致神经毒性,特别是致神经元退变的机制,目前还不完全清楚。氧化应激损伤在神经元退变中的意义已得到充分肯定。中枢神经系统损伤和衰老过程中出现明显的氧化应激反应,而具有明显抗氧化应激

的药物有不同程度的神经保护作用。本实验结果显示，慢性铝负荷导致大鼠海马 SOD 活性明显降低、MDA 含量显著升高。与本研究结果相似，有研究显示铝负荷可导致家兔或大鼠脑组织 SOD 活性明显降低、MDA 含量显著升高[10,11]。MAO-B 主要代谢中枢神经系统中的儿茶酚胺和 5-羟色胺，在慢性神经元退行性疾病中，中枢 MAO-B 活性是影响自由基形成的一个重要因素[12]。已有文献报道，外周血小板 MAO-B 的活性增强与各种中枢神经疾患导致的痴呆症状有关[13]，随着年龄增加而 MAO-B 活性增强。本实验结果也显示，慢性铝负荷导致大鼠海马 MAO-B 活性显著升高。这些结果提示，与其他类型的脑损伤相似，氧化应激损伤、单胺能神经系统及递质紊乱也参与了慢性铝过负荷致脑损伤、神经元退变过程。

尼莫地平为二氢吡啶类钙通道阻滞剂，对缺血再灌注脑损伤有明显保护作用[14]。本研究结果还显示，尼莫地平给予能明显改善慢性铝过负荷所致的脑损伤、学习记忆障碍，能升高铝负荷大鼠脑组织的 SOD 活性，降低 MAO-B 活性和 MDA 含量，这一方面提示细胞内钙超载是铝神经毒性的重要机制之一，另一方面也提示钙通道阻滞剂尼莫地平可能成为铝过负荷致脑损伤、神经元退行性疾病的有效防治药物。

参考文献：

[1] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, *et al*. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice[J]. Science, 1996, 274(5284): 99 - 102.

[2] Bharathi, Shamasundar N M, Sathyanarayana-Rao T S, *et al*. A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2006, 52(2): 275 - 292.

[3] Miu A C, Benga O. Aluminum and Alzheimer's disease: a new look [J]. J Alzheimers Dis, 2006, 10(2 - 3): 179 - 201.

[4] 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.

[5] Hanninen H, Matikainen E, Kovala T, *et al*. Internal load of aluminum and the central nervous system function of aluminum welders[J]. Scand J Work Environ Health, 1994, 20(4): 279 - 285.

[6] 聂文信，杨为宁，白永权. 普通人群的铝接触[J]. 国外医学：医学地理分册, 1998, 19(3): 121 - 122, 125.

[7] Yang J Q, Liu B Z, He B C, *et al*. Protective effects of meloxicam on aluminum overload-induced cerebral damage in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 547(1 - 3): 52 - 58.

[8] 杨俊卿，周岐新. 亚急性一氧化碳中毒致小鼠迟发性脑损伤模型的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1998, 23(4): 332 - 334.

[9] Luo J, Yin J H, Wu, H Z, *et al*. Extract from Fructus cannabis activating calcineurin improved learning and memory in mice with chemical drug-induced dysmnesia[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(11): 1137 - 1142.

[10] Jyoti A, Sharma D. Neuroprotective role of Bacopa monniera extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain[J]. Neurotoxicology, 2006, 27(4): 451 - 457.

[11] Abd-Elghaffar S Kh, El-Sokkary G H, Sharkawy A A. Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2005, 26(5): 609 - 616.

[12] Riederer P, Danielczyk W, Grunblatt E. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease[J]. Neurotoxicology, 2004, 25(1 - 2): 271 - 277.

[13] Gotz M E, Fischer P, Gsell W, *et al*. Platelet monoamine oxidase B activity in dementia. A 4-year follow-up[J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 1998, 9(2): 74 - 77.

[14] 王国强，邵淑琴，廖维宏. 脑缺血-再灌流损伤后生长抑素及其 mRNA 表达及$[Ca^{2+}]_i$改变与尼莫地平影响的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(3): 244 - 246.

（编辑　汪勤俭）

（上接 1027 页）

子宫和盆腔的脉管内生长，也有经延伸下腔静脉，甚至心脏而引起死亡[3]。国内连续报道有 11 例子宫脉管内平滑肌瘤，向宫外蔓延，均表现为蠕虫状、条索状、大小不等结节状，其中有 1 例肿瘤大小为 30 cm × 20 cm × 18 cm，均为实性。而本例肿瘤为囊实性包块，囊内积液达 3 000 ml，实属罕见。

由于本例包块源于宫颈后壁，压迫输尿管而引起双肾积水，手术时宫颈旁和阴道壁不易暴露，特别是输尿管移位，给手术带来一定的困难。术中处理子宫动脉时应注意解剖关系，避免输尿管的损伤。由于此病与性激素有关，且有研究证实增生的血管内平滑肌中有雌激素和孕激素受体存在[4]，治疗宜行全子宫双附件及子宫外肿瘤切除术，术中避免应用外源性激素，以免引起复发，并应长期随访。

宫颈血管平滑肌瘤与宫颈平滑肌瘤在肉眼上难以鉴别，主要靠病理检查鉴别。血管平滑肌瘤镜下特点：由平滑肌细胞和较丰富的小血管构成，血管平滑肌细胞成束，排列紊乱，血管壁增厚，常见血管平滑肌细胞围绕血管呈致密的螺旋状排列。而宫颈平滑肌瘤镜下呈条索交错状，由纤维结缔组织间隔，血管较少，可予以鉴别。

关键词：子宫颈血管平滑肌瘤；宫颈平滑肌瘤
中图法分类号：R737.33　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 徐大华. 超声诊断皮下血管平滑肌瘤 1 例[J]. 中华现代影像学杂志, 2006, 3(1): 13.

[2] 陈玉梅，金　黎，郑士凤. 子宫肌瘤与泌乳素关系的初步观察[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(15): 119.

[3] 刘惜时，张锦明. 子宫脉管内平滑肌瘤的生物学行为与临床处理[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(12): 730 - 732.

（编辑　张大春）