慢性砷中毒对小鼠海马 CA1 区星形胶质细胞的影响

蒋 鹍,孙宝飞 (贵阳医学院基础医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 观察慢性砷中毒对成年小鼠海马 CA1 区星形胶质细胞的影响,探讨慢性砷中毒对成年小鼠脑部的神经毒性。**方法** 选取健康成年昆明小鼠 60 只,雌雄各半,分为对照组、慢性砷中毒组,每组 30 只,分别以蒸馏水、1/10 LD_{50} As_2O_3 即 As_2O_3 4.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} 灌胃,连续 3 个月,根据其体重变化随时调整用药剂量。灌胃结束后,采用 Y 型电迷宫检测各组小鼠学习与记忆的功能,其后取小鼠海马组织,利用免疫组织化学技术检测砷中毒对小鼠海马 CA1 区胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。**结果** 与正常对照组比较,砷中毒组小鼠的学习、记忆能力明显低于对照组($P<0.05$);免疫组化染色显示小鼠海马 CA1 区 GFAP 阳性细胞明显增多($P<0.05$),阳性反应产物平均光密度增高($P<0.05$)。**结论** 慢性砷中毒可引起小鼠海马 CA1 区星形胶质细胞反应性增生。

[关键词] 砷中毒;胶质原纤维酸性蛋白;海马;小鼠
[中图分类号] R595;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)03-0239-03

Effect of chronic arsenic poisoning on astrocyte in hippocampal CA1 area of mouse

JIANG Dong, SUN Bao-fei (Department of Anatomy, Basic Medical College, Guiyang Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To observe the effect of chronic arsenic poisoning on astrocytes in the hippocampal CA1 area and to investigate the neurotoxicity of chronic arsenic poisoning in adult rats. **Methods** Totally 60 healthy adult Kunming mice were divided into chronic arsenic poisoning group and control group. 1/10 LD_{50} As_2O_3 was given for 3 months by digestive tract (4.5 mg·kg^{-1}·d^{-1}) in chronic arsenic poisoning group while equal amont of distilled water was given in control group. The abilities of learning and memorizing were tested by Y-maze. The glial fibrillary acidic protein(GFAP)-positive cells in the hippocampal CA1 area were quantitatively analyzed with cell morphometric technique. **Results** Compared with control group, the changes in chronic arsenic poisoning group were: the ability of learning and memorizing were significantly lower than those in control group ($P<0.05$); the numbers and average optical density of GFAP-positive cells in the hippocampal CA1 area were increased than those of control group ($P<0.05$). **Conclusion** Chronic arsenic poisoning can increase the number of astrocyte in the hippocampal CA1 area.

Keywords: arsenic poisoning; glial fibrillary acidic protein; hippocampal; mouse

砷是一种广泛分布于自然界的类金属元素,通过消化道、呼吸道等长期、过量地摄入砷化合物而引起慢性砷中毒[1]。长期饮用含砷水的儿童语言能力和长期记忆力下降[2]。这意味着砷对管理学习记忆的组织有毒性损伤作用,而海马是学习记忆的重要中枢,研究砷对海马的毒性作用,为揭示砷在脑发育过程中的毒性机制提供实验数据。本实验通过建立慢性砷中毒小鼠动物模型,从免疫组化方面研究砷中毒致海马 CA1 区的损害,深入研究地方性砷中毒的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取健康成年昆明小鼠 60 只,体重 20~22 g,雌雄各半,随机分为 2 组,每组 30 只。染毒所用砷剂量按三氧化二砷(As_2O_3)对小鼠经口半数致死量(LD_{50})设定。中毒组以 1/10 LD_{50} 即 As_2O_3 4.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} 灌胃;对照组以灭菌蒸馏水灌胃;根据其体重变化而随时调整剂量。均用普通饲料喂养,自由饮用自来水。造模过程中每天观察小鼠进食、活动、反应、粪便、皮毛、死亡等情况并做好记录。

1.2 取材与制片

3 个月后,各组小鼠用 3.6% 水合氯醛按每 100 g 体重1 mL 腹腔麻醉,通过左心室及升主动脉插管,剪开右心房,先用 37 ℃生理盐水冲洗,见右心房流出液变清,再灌注 100 mL 4% 多聚甲醛固定。开颅取脑后用 4% 多聚甲醛进一步固定,每只鼠脑经冠状面均匀切成三段,取中间含海马段,经脱水、石蜡包埋后,连续冠状切片,片厚 6 μm,隔二取一用来进行 HE 染色(用于定位)及胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic portein, GFAP)免疫组化染色。

1.3 免疫组化染色(SABC 法)

石蜡切片常规脱蜡至水,置于蒸馏水新鲜配置的 3% 的 H_2O_2 中 10 min,以灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次,微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min 后,重复 1 次,以修复抗原,冷却后

[基金项目] 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教科 2007-031)
[作者简介] 蒋 鹍(1977-),女,湖南省邵东县人,讲师,医学硕士,主要从事重金属对中枢神经的影响方面的研究。E-mail: jiangdong770126@yahoo.com.cn
[收稿日期] 2011-01-13 [修回日期] 2011-01-29

0.02 mol/L PBS 洗 2 次,滴加 5% 正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余的液体,不洗,滴加一抗即 GFAP(1∶200),湿盒中孵育,4 ℃过夜,0.02 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,湿盒中 37 ℃孵育 20 min,0.02 mol/L PBS 洗 2 min × 3次,滴加 SABC,湿盒中 37 ℃孵育 20 min,0.02 mol/L PBS 洗5 min × 4次,DAB 显色,镜下控制显色深度,蒸馏水洗涤,脱水、透明、封片。结果判定以胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞;对照切片用磷酸盐缓冲液取代一抗,其余步骤同实验组。

1.4 Y 型电迷宫行为学测验

学习功能检测:在灌胃 90 d 后进行三等份辐射式迷宫(Y 型迷宫)测验,在安静、较暗环境下进行。将小鼠放入迷宫的任何一臂中,小鼠在三条臂中自由移动,熟悉环境 3 min。然后以小鼠所在的臂为起始臂,另外两条臂的其中一条臂启动灯光信号,延迟 5 s 后,没有灯光信号的两条臂(起始臂和另外一条臂)通电电击小鼠,以训练小鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力,以连续 9 次(90%)走向正确后的次数为小鼠学习行为能力,达到学会标准所需训练次数越少表示小鼠学习能力越强。电刺激参数:电压 36 V。记忆功能检测:隔 24 h 后再次测定,连续检测 10 次,记录这 10 次反应中正确反应尚保持次数,以正确次数的百分率作为小鼠的记忆能力。

1.5 图像分析及统计学处理

光镜下,采用 Mias 图像分析软件,每个鼠脑取相同间隔的 2 张切片,对每张切片的相应部位各测 3 个视野,在同一放大倍数(×400),同一视场面积,同一背景光强度下,分别对海马 CA1 区 GFAP 阳性细胞进行计数,并测量 GFAP 阳性反应产物的平均光密度值。测定结果用 SPSS 11.5 统计软件进行统计处理,数据结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均值间比较用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况变化

在整个实验过程中,对照组小鼠活动正常,被毛光滑,中毒组小鼠饮水量与进食量和对照组小鼠比较有所减少,染毒后期表现更为明显,具体表现为活动减少、迟滞、体重下降、被毛光泽度差,个别动物有掉毛现象。

2.2 小鼠学习记忆变化

在灌胃 90 d 后对小鼠进行 Y 型迷宫学习记忆的成绩试验,中毒组小鼠达到学会标准所需训练次数明显高于对照组,24 h 后记忆保持率也明显低于对照组;中毒组小鼠在学习和记忆方面分别与对照组比较,有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

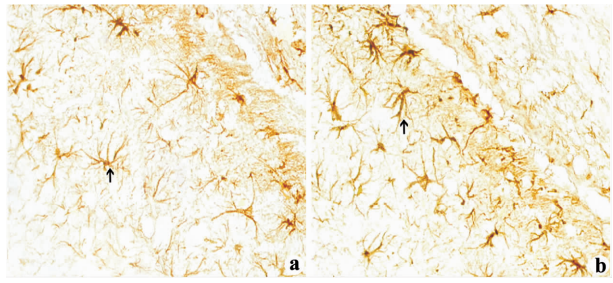
表 1 小鼠 Y 型迷宫行为学结果($\bar{x} \pm s$)

组别	达到学会标准所需训练次数	24 h 后记忆保持率(%)
对照组	21.41 ± 2.35	6.97 ± 3.08
中毒组	26.96 ± 4.58 *	5.64 ± 1.52 *

*:与对照组比较,$P < 0.05$

2.3 海马 CA1 区 GFAP 蛋白表达

光镜下,对照组海马 CA1 区 GFAP 免疫组化染色阳性细胞数量较少、稀疏,细胞突起多,部分胞突又发出较多的分支,胞浆及胞突内见棕黄色反应颗粒,染色较淡,胞核位于中央(图 1a);中毒组海马 CA1 区 GFAP 免疫组化染色阳性细胞数量多($P < 0.05$),分布密集,胞体星形,胞体大,突起多,胞浆内有丰富的棕黄色阳性反应颗粒,染色较深(图 1b),两组 GFAP 阳性细胞计数和阳性反应产物的平均光密度测量结果见表 2。



a:对照组,细胞排列稀疏,胞浆内棕黄色反应颗粒染色浅;b:中毒组,细胞分布密集,胞浆内有棕黄色阳性反应颗粒,染色深

图 1 GFAP 的表达(SABC ×400)

表 2 小鼠海马 CA1 区 GFAP 阳性细胞计数、阳性产物平均光密度($\bar{x} \pm s$)

组别	阳性细胞数(个/视野)	平均光密度
对照组	15.82 ± 2.45	0.4766 ± 0.0543
中毒组	22.38 ± 1.96 *	0.5867 ± 0.0154 *

*:与对照组比较,$P < 0.05$

3 讨论

海马是脑边缘系统中的重要结构,与学习、记忆、认知功能有关,尤其是短期记忆与空间记忆[3]。地方性砷中毒病区儿童智商均值比全国农村儿童智商理论分布值低,说明病区儿童智力发育障碍,智力受到了不同程度的损伤[4]。本研究采用了 Y 型迷宫实验来研究砷中毒后小鼠学习记忆能力的变化,结果表明砷中毒显著降低了小鼠的学习和记忆能力。星形胶质细胞在中枢神经系统起着神经调节、保护 pH 平衡、神经发育过程中的轴突生长控制、内环境稳定和血脑屏障维护等作用。星形胶质细胞也参与多种神经病理变化,在几乎所有中枢神经系统的病变过程中都能观察到星形胶质细胞形态和功能的变化。GFAP 是细胞骨架的中间细丝蛋白,特异表达于星形胶质细胞。GFAP 表达量的增加反映了星形胶质细胞的增生和发育,在神经元损伤后的修复保护中有重要意义,目前已成为正常及病理情况星形胶质细胞的特异性标记物。缺血、缺氧、中毒等原因可引起脑组织的损伤而导致星形胶质细胞增生[5]。大鼠创伤性脑损伤后大量的星形胶

质细胞活化,其提示星形胶质细胞参与了脑组织的损伤过程[6]。本实验研究发现,慢性砷中毒组小鼠海马 CA1 区 GFAP 免疫组化染色阳性细胞数量明显增多,分布密集,胞体较大,突起多,胞浆内有丰富的棕黄色阳性反应颗粒,染色深,提示星形胶质细胞增生。

星形胶质细胞与神经元功能密切相关,活化后的星形胶质细胞对神经元的影响是多方面的、复杂的。一方面通过分泌大量的神经营养因子、细胞因子和基质分子促进轴突再生,支持神经细胞存活和轴突生长的能力,使神经元免受损伤,有利于损伤后神经元的功能恢复;在星形胶质细胞受损的区域,神经细胞不能存活,突触重建也不可能发生,只有当星形胶质细胞存活的情况下,轴突生长锥才能长出,从而有可能代偿损伤的神经细胞[7]。另一方面星形胶质细胞的增生和功能增强反过来也可能加剧对神经元的损伤,因为反应性星形胶质细胞亦能分泌对轴突生长和神经元存活的抑制性分子,可致轴突再生失败;也能产生某些神经毒性物质造成神经损伤。星形胶质细胞激活的同时也释放对神经元不利的因子参与机体免疫应答和炎症反应;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH-D)表达增加,使一氧化氮合酶(NOS)活性增加,NO 增多表现神经毒的作用;内皮素-1、3(ET-1、3)可能通过 NOS 途径行使神经毒性的作用[8]。

星形胶质细胞在砷中毒后大量增生,可视为星形胶质细胞的一种功能性反应。因为星形胶质细胞再生后仍保留分裂能力,在创伤和受刺激时可进行有丝分裂。此时,星形胶质细胞数量增加,具有较多的突起和胶质丝,代谢活动也增强,胶质细胞及其突起可包围损伤和变性的神经结构,甚至导致胶质瘢痕形成。本实验也发现,慢性砷中毒组海马 CA1 区 GFAP 免疫组化染色阳性细胞数量明显增多,提示星形胶质细胞增生参与了慢性砷中毒的脑损伤过程。

[参考文献]

[1] 张爱华. 生物标志物在地方性砷中毒研究中的应用及展望[J]. 中国地方病学杂志,2005,24(2):119 - 120.

[2] 朱筑霞,潘玮炜,易必达,等. 砷致大鼠海马神经细胞凋亡对学习记忆功能的影响[J]. 贵州医药,2010,34(9):777 - 780.

[3] Von Ehrenstein OS, Poddar S, Yuan Y, et al. Children's intellectual function in relation to arsenic exposure[J]. Epidemiology, 2007, 18(1):25 - 26.

[4] 李 军,王三祥,王正辉,等. 砷中毒病区儿童智力水平调查[J]. 中国公共卫生,2006,22(7):856 - 857.

[5] 夏 斌,姚裕家,陈大鹏,等. 新生鼠实验性缺血缺氧性脑损伤时大脑皮质 NSE 和 GFAP 的变化[J]. 西安交通大学学报(医学版),2004,25(5):443 - 445.

[6] 衣 昕,毛伟峰,秦建兵,等. 大鼠创伤性脑损伤后星形胶质细胞的变化[J]. 中国临床解剖学杂志,2006,24(5):536 - 540.

[7] 孙宝飞,余资江,康朝胜. 慢性砷中毒对小鼠齿状回超微结构及学习记忆的影响[J]. 局解手术学杂志,2009,18(6):444.

[8] 彭俊忠,朱家祥,童逸龄,等. 激活的星形胶质细胞分泌的 TNF-α 与癫痫的相关性[J]. 解剖学杂志,2005,28(1):1 - 4.

(编辑:左艳芳)

(上接第 238 页)

PNS[9],而 PNS 却能够再生,说明在 PNS 中可能存在某种机制使得其不受 Nogo 再生抑制作用的影响。Nogo-A 的受体 NgR 也在神经元以外的其他细胞如少突胶质细胞表达[10],提示 Nogo-A 也可能通过其受体 NgR 对少突胶质细胞发挥不同于再生抑制的其他作用。对 Nogo-A 的深入研究将有助于进一步完善对 CNS 髓鞘抑制蛋白的认识。

[参考文献]

[1] GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein[J]. Nature, 2000, 403(6768):439 - 444.

[2] Mukhopadhyay G, Doerty P, Walsh FS, et al. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration[J]. Neuron, 1994, 13(3):757 - 767.

[3] Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo rreceptor ligand that inhibits neurite outgrowth[J]. Nature, 2002, 417(6892):941 - 944.

[4] Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. J Neurosci, 2002, 22(9):553 - 567.

[5] Chen MS, Huber AB, Van der Haar, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(6768):434 - 439.

[6] Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading[J]. J Cell Biol, 1988, 106(4):1281 - 1288.

[7] Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans[J]. Nature, 2000, 403(6768):383 - 384.

[8] Guo Q, Li S, Su B. Expression of oligodendrocyte myelin glycoprotein and its receptor NgR after the injury of rat central nervous system[J]. Neurosci Lett, 2007, 422(2):103 - 108.

[9] Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, et al. Nogo mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury[J]. Exp Neurol, 2001, 169(2):319 - 328.

[10] Sandvig A, Berry M, Barrett LB, et al. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration[J]. Glia, 2004, 46(3):225 - 251.

(编辑:文 灿)