镉对慢性镉中毒小鼠黑质神经元的损害及维生素 C 的拮抗作用

戈 果,余资江,朱俊德 (贵阳医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 研究维生素 C(VC)对慢性镉中毒小鼠黑质神经元的保护作用。**方法** 将 75 只雄性昆明种小鼠随机分为 3 组,每组 25 只。镉中毒组皮下注射氯化镉($CdCl_2$),每周 2 次,每次 2 mg/kg,VC 加镉组(VC 组)上述方法和剂量染镉外,VC 按每次 25 mg 稀释后灌胃,正常组同时给予生理盐水。3 个月后对小鼠进行 Y 型迷宫学习能力检测,并通过光镜及透射电镜观察小鼠黑质神经元的细微结构。**结果** Y 型迷宫检测显示,VC 组与镉中毒组相比,小鼠的学习、记忆能力均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。光镜和电镜结果显示,VC 组小鼠中脑黑质区结构接近正常组,与镉中毒组比较有明显差异。**结论** 抗氧化剂 VC 对慢性镉中毒组小鼠黑质神经元有显著的保护作用。

[关键词] 镉;维生素 C;黑质;细微结构;小鼠
[中图分类号] R595.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)02-0120-04

Impairment on neurous of substantia nigra in chronic cadmium poisoning mice and antioxidation effects of vitamin C

GE Guo, YU Zi-jiang, ZHU Jun-de (Department of Anatomy, Guiyang Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of vitamin C on the neurons of substantia nigra in chronic cadmium poisoning mice. **Methods** Totally 75 male Kunming mice were randomly divided into three groups: cadmium poisoning-exposed group (Cd-exposed group), vitamin C treatment group and control group ($n=25$). Cd-exposed group was given $CdCl_2$ (2 mg/kg each time) subcutaneously and semiweekly (2 mg/kg each time). Vitamin C treatment group was given $CdCl_2$ simultaneously and semiweekly (2 mg/kg each time), meanwhile vitamin C was administered perorally everyday (25 mg each time). Control group was only given equival physiological saline subcutaneously. The learning and memory abilities were detected by Y-maze after three months of treatment. Then the microstructure of the substantia nigra was observed under light microscopy and transmisson electronicm icroscopy. **Results** According to the results of Y-maze test, the learning and memory capacity in vitamin C treatment group were lower than those in Cd-exposed group ($P<0.05$) and there was no difference compared with those in control group ($P>0.05$). The microstructure of the substantia nigra in vitamin C treatment group was similar to that in control group, but it was obviously different from that in Cd-exposed group. **Conclusion** The antioxidants of vitamin C could efficiently protect the neurons of substantia nigra in chronic cadmium poisoning mice.

Keywords: cadmium; vitamin C; substantia nigra; microstructure; mouse

镉(cadmium,Cd)广泛存在于生产和生活中,是一种有毒重金属,对机体可造成严重的损害。随着镉产量和用量的增加,镉中毒在世界的不同地区发生。镉除了对肾、肝、肺、骨、生殖和免疫等器官系统产生一系列损伤外,对神经系统也有明显的毒性作用,且与其诱导的氧化损伤密切相关[1-2]。维生素 C(VC)是一种有效的抗氧化剂,它的最大特性是还原性,通过还原作用消除有害氧自由基的毒性。但有关 VC 对慢性镉中毒小鼠黑质区域的形态学研究尚未见报道。本实验通过采用 Y 型迷宫进行学习记忆能力测试,对正常组、镉中毒组及 VC 组小鼠中脑黑质神经元进行 HE 染色、尼氏染色、TH 免疫组化染色和透射电镜观察,分析 VC 对慢性镉中毒小鼠学习记忆能力和黑质区神经元的形态学影响,以期探讨 VC 对慢性镉中毒小鼠黑质神经元的保护作用,为研究镉中毒的危害及防治提供一定的形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

LEICA RM 2015 回转式切片机(上海徕卡仪器有限公司);H-600 型透射电镜(日本日立公司)。氯化镉($CdCl_2$,分析纯,北京 57601 化工厂,批号:10873005);维生素 C 注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号:H44022383);酪氨酸羟化酶抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA1454)。采用 Y 型迷宫初步筛选出健康清洁级雄性 3 月龄昆明小鼠 75 只,由贵阳医学院动物中心提供,合格证号为:SCXK(黔)2002-0001。

[基金项目] 贵州省社会发展科技攻关计划项目黔科合[2010]筑科农合同字第 1-社-14 号;贵州省科技计划黔科合[2010]3159

[作者简介] 戈 果(1974 -),女,河南省南阳市人,副教授,医学硕士,主要从事人体解剖学方面的研究。电话:(0851)6908658,E-mail:geguox@sina.com

[收稿日期] 2011-11-11 [修回日期] 2011-12-15

1.2 方法

将小鼠随机分为正常组、镉中毒组、VC 组,每组 25 只。全部小鼠在正常温控、光照及自由摄食条件下饲养。每周称量小鼠体重,观察一般情况,注意小鼠的活动、食欲、饮食量、毛发、反应等。定期用迷宫测定记忆力。镉中毒组用双蒸水配制的氯化镉溶液按每次 2 mg/kg(给药体积为 5 mL/kg 计算),经皮下注射,每周 2 次。正常组经皮下注射等量生理盐水。VC 组除按上述方法和剂量染镉外,VC 按每次 25 mg 经"金龙鱼"油稀释后灌胃。

1.3 小鼠学习记忆能力检测方法

采用 Y 型迷宫随机休息法进行学习能力的检测。在 3 个月后进行 Y 型迷宫测验,在安静、较暗环境下进行。安全区以无规则次序变换,以训练小鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力。小鼠受电击后逃到安全区后,灯光继续作用 10 ~ 15 s,熄灯后结束 1 次测试,小鼠所在支臂就作为下一次测试的起点,间隔 30 s 后再进行第 2 次测试,依次重复。每天每只小鼠连续测试 10 次,有 9 次以上正确逃到安全区作为学习正确判定标准。正确逃避数定为 A,以 A/10 表示学习的正确率,此值越高说明学习能力越好。于学习能力测试完休息 24 h 后,再以同样方法进行测试小鼠记忆保持能力。观察各组小鼠在 10 次切换中有几次正确反应。

1.4 染色方法

1.4.1 取材与制片 3 个月后将小鼠处死并取心脏做灌注固定,开颅取脑。整个中脑用 Bouin 液进一步固定,石蜡包埋、切片、染色(包括 HE、尼氏法、TH 免疫组化 ABC 法)并用光镜观察。电镜观察部分每组随机取 3 只小鼠,麻醉后用2.5% 戊二醛磷酸缓冲液灌注固定。取黑质区域 1 mm 大小组织块,用锇酸(10 g/L)固定 4 h,丙酮梯度脱水,Epon812 包埋,ULTRACUT-E 型超薄切片机切片,制作超薄切片。本实验所观察的黑质区域平面是参考 Paxions Watson 图谱经上丘和脚间核的冠状切面。

1.4.2 染色方法 TH 免疫组化 ABC 法染色,步骤如下:切片分别经 3% 过氧化氢 10 min,原修复液 10 min,正常血清封闭液 20 min,TH 抗原(1∶1 600)37 ℃孵育 1 h,生物素化二抗 37 ℃孵育 1 h,ABC 37 ℃孵育 1 h,DAB 显色。以上各步骤间均用 0.01 mol/L PBS 液洗 3 次,每次 5 min。结果判定:以胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性反应。电镜样品超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,在 80 kV 电压下用日立 H-600 型透射电镜观察并摄片。

1.4.3 计量分析 文中数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 软件,方差分析,q 检验比较,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精神行为表现

正常组小鼠体重增加,被毛光滑,食欲、活动、反应正常。镉中毒组小鼠 2 周后出现活动及反应性明显减少,行动迟缓,显得无精打采,进食量明显减少,体重下降,毛发稀疏、脱落,少数小鼠步态不稳。VC 组小鼠活动未见明显减少,饮食稍差,体重未见明显下降。染毒后第 1 个月、第 2 个月和第 3 个月与镉中毒组比较,正常组、VC 组小鼠体重较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而正常组和 VC 组比较,差异无统计学意义,见表 1。

表 1 各组小鼠体重变化($\bar{x} \pm s$, $n = 25$, g)

组别	染毒前	第 1 个月	第 2 个月	第 3 个月
正常组	25.32 ± 0.35	28.10 ± 0.58	29.25 ± 0.17	29.58 ± 0.89
镉中毒组	25.25 ± 0.41	24.00 ± 0.12*	23.64 ± 0.26*	23.29 ± 0.40*
VC 组	25.26 ± 0.52	27.05 ± 0.56	27.55 ± 0.14	27.87 ± 0.25

*:与正常组比较,$P < 0.05$

2.2 小鼠学习记忆的变化

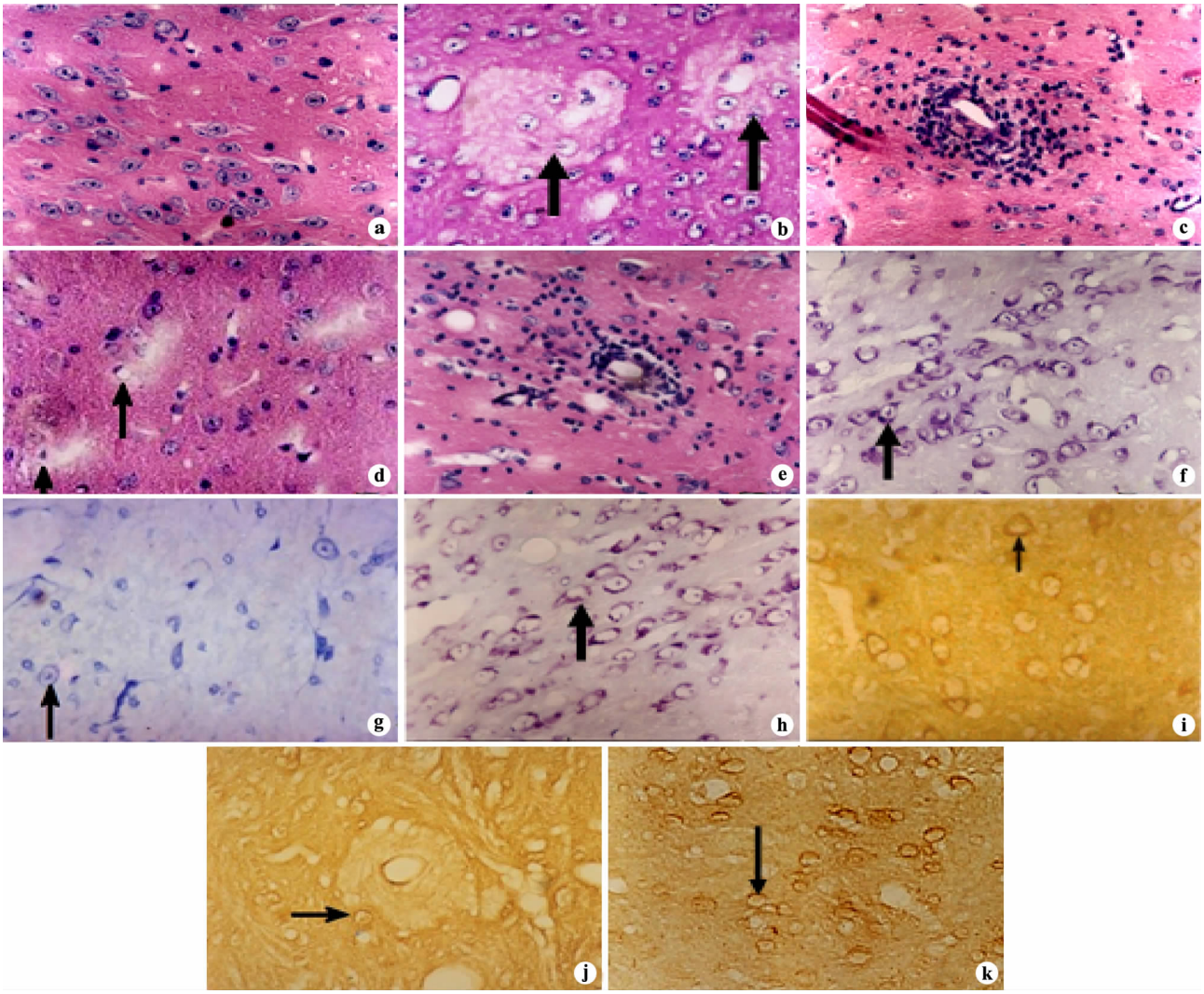
经 Y 型迷宫检测,正常组的学习正确率和记忆保持率分别为:29.12 ± 0.34 和 85.12 ± 0.55,镉中毒组和 VC 组分别为:21.53 ± 0.38、72.28 ± 0.39 和 28.56 ± 0.32、84.67 ± 0.57。与正常组和 VC 组相比,镉中毒组小鼠学习、记忆能力均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);VC 组与正常组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 光镜观察

正常组 HE 染色可见黑质区域细胞密集成群,绝大部分细胞为大多角形或锥体形,神经元胞体及胞核较大,核仁清晰,胞浆比较丰富。尼氏染色黑质区域有成群分布的大多角形或锥体形细胞,胞浆内尼氏体丰富。TH 免疫组化染色可见黑质区大量的 TH 阳性细胞,胞浆内有丰富的棕黄色 TH 阳性反应颗粒。镉中毒组 HE 染色可见黑质区神经元数量明显减少,部分神经元丧失大多角形或锥体形状,少数细胞核固缩,胞浆减少,胞浆内可见大小不等的嗜酸性颗粒。小鼠黑质区域可见较大的软化灶,病灶呈圆形或卵圆形,边界清楚,灶内呈镂空筛网状,绝大多数神经元消失。大部分小鼠黑质区域内尚见广泛的淋巴细胞浸润,形成血管套。尼氏染色黑质区神经元明显减少,胞浆内尼氏体减少或消失,着色浅。TH 免疫组化染色黑质区 TH 阳性细胞也明显减少,胞浆内 TH 阳性反应颗粒较少。VC 组 HE 染色黑质区神经元有少量减少,部分神经元变性,细胞呈圆形或卵圆形。小鼠黑质区有散在小面积软化灶形成,残留神经元胞体变小,胞核固缩。黑质区可见弥漫性淋巴细胞浸润,部分淋巴细胞围绕在小血管周围形成血管套。尼氏染色细胞形态大多正常,胞浆内尼氏体有少量减少。TH 免疫组化染色黑质区有大量 TH 阳性反应神经元,胞浆内 TH 阳性反应颗粒较正常组有所减少(图 1)。

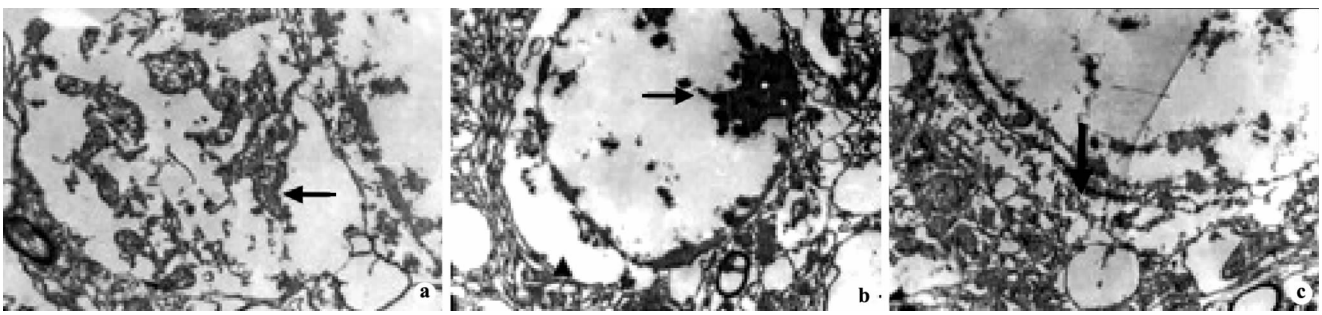
2.4 电镜观察

正常组神经元胞体较大,核周质内有较发达细胞器,核膜光滑、完整,染色质分布均匀。镉中毒组神经元胞体缩小,胞核浓缩变形,核染色质电子密度增高、边聚,核膜断裂。核周隙可见扩张,核周质内细胞器减少和消失。VC 组核膜边界清晰完整,核染色质轻度边聚,核周细胞器有所减少,线粒体有轻度肿胀,偶见空泡化(图 2)。



a:正常组黑质区神经元(HE 染色);b:镉中毒组黑质区较大的软化灶(HE 染色);c:镉中毒组黑质区血管套(HE 染色);d:VC 组黑质区较小的软化灶(HE 染色);e:VC 组黑质区淋巴细胞浸润(HE 染色);f:正常组黑质区神经元(尼氏染色);g:镉中毒组黑质区神经元(尼氏染色);h:VC 组黑质区神经元(尼氏染色);i:正常组黑质区 TH 阳性反应神经元(TH 免疫组化染色,SABC 法);j:镉中毒组黑质区 TH 阳性反应神经元(TH 免疫组化染色,SABC 法);k:VC 组黑质区 TH 阳性反应神经元(TH 免疫组化染色,SABC 法)

图 1　黑质区神经元光镜观察(×300)



a:正常组;b:镉中毒组;c:VC 组

图 2　黑质区神经元透射电镜观察(×10 000)

3 讨论

Cd 是一种对人体健康危害严重的环境污染物。它在神经系统累积时就会损伤脑功能,其含量过高,会造成以降低智力、神经元退化和细胞死亡为特征的脑病,即使含量很低,也可有不同程度的损害。给大鼠一次性皮下注射氯化镉 10 mg/kg,可引起急性出血性病变,并选择性地损害半月神经节和脊神经的感觉神经节。主要病理改变为神经节细胞周围出血,某些神经节细胞呈核固缩,核裂解,细胞溶解[3]。Cd 对神经系统不仅造成形态学上的改变,也影响精神行为方面。Gabbiani 等[4]指出,成年鼠染 Cd 后显得无精打采,但是对痛苦的刺激反应敏感且表现强烈。有研究发现精神发育迟缓与学龄儿童头发中 Cd 含量的增加有一定关系。提示 Cd 可能引起肉眼可见的畸形,或通过改变神经递质的传递,引起细微的行为影响[5]。本实验中,Cd 中毒小鼠中脑黑质受损,出现了类似的结构和功能的改变。主要改变有:①神经元变性、坏死;②黑质区有严重的软化灶形成;③炎症反应,以淋巴细胞浸润为主,并形成血管套;④黑质区 TH 阳性反应神经元明显减少;⑤精神行为改变。

Cd 的神经系统毒性机制较为复杂,主要是:①抑制一些含巯基酶的活性及影响中枢神经递质的含量;②Cd-Ca 相互作用,Cd 的毒性可能是使细胞内 Ca 稳态失衡而引起;③Cd 参与氧化损伤,镉可以通过增强细胞膜系统的脂质过氧化反应,产生大量自由基,造成细胞氧化损伤[6]。Cd 可致脂质过氧化水平升高,抑制抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽还原酶(GSH-Px)的活性,影响 GSH 和 VE 的水平[7]。随着研究的不断深入,Cd 所诱导的氧化损伤已成为神经系统毒性机制的主要方面。

VC 由于具有潜在的抗氧化反应和清除自由基的能力而受到广泛关注[8-9]。有报道在 VC 慢性给药中,大鼠急性应激状态时脑组织 SOD 活力未见明显改变,提示维生素 C 具有非常强的抗自由基作用,基本能消除自由基对神经细胞的损害,从而具有神经保护作用[10]。本实验结果显示:镉中毒组小鼠活动及反应性明显减少,行动迟缓,进食量明显减少,体重下降,毛发稀疏、脱落,少数小鼠步态不稳;Y 迷宫实验表明镉染毒显著降低了小鼠的学习和记忆能力。而 VC 组小鼠不仅精神行为表现较正常,Y 迷宫实验也显示 VC 对小鼠学习记忆能力有明显保护作用。此外黑质区神经元的变性、退化及坏死程度均明显改善。与镉中毒组相比,仅有初期轻微的软化灶形成,少数小鼠出现淋巴细胞浸润,TH 免疫组化染色 TH 阳性反应颗粒稍有减少;电镜观察 VC 组小鼠胞核核膜完整清晰,核染色质轻度边聚,线粒体嵴断裂、空泡化程度都相对较轻。这些形态学的表现说明经 VC 处理后黑质神经元的损伤程度减轻,结构和功能接近正常,进一步从形态学方面证实了 VC 可保护神经组织免受 Cd 引起的自由基增多及氧化损伤所造成的损害[11],为镉中毒的危害及防治提供一定的形态学依据。

[参考文献]

[1] 卞建春,路 浩,梅 莉,等. 铅镉联合染毒对大鼠大脑皮质神经细胞的氧化损伤及 NAC 的保护效应[J]. 中国兽医科学,2008,38(9):805 - 809.

[2] 关 坤,徐兆发,张芳林,等. 镉致大鼠肝线粒体氧化损伤的实验研究[J]. 中国工业医学杂志,2009,2(3):207 - 209.

[3] Wen YF, Zhao JQ, Bhadauria M, et al. Pyridoxine mitigates cadmium induced hepatic cytotoxicityand oxidative stress[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2010, 30(2): 169 - 174.

[4] Gabbiani G, Gregory A, Bai D. Cadmium-induced selective lesions of sensory ganglia[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1967, 26(3): 498 - 506.

[5] Roelerel N, 赵进顺. 职业暴露与子代中枢神经系统缺陷[J]. 国外医学·卫生学, 1992, 19(1): 7 - 9.

[6] 黄秋婵,韦友欢,黎晓峰. 镉对人体健康的危害效应及其机理研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2528 - 2531.

[7] 袁 燕,刘学忠,卞建春,等. 镉对大鼠大脑皮质神经细胞的氧化损伤及 N-乙酰半胱氨酸的保护效应[J]. 中国兽医学报,2011,31(3):391 - 401.

[8] 韩 雪,陈小连,徐建雄. 复合抗氧化剂对小鼠氧化应激与自由基代谢的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2010,28(6):526 - 529.

[9] 葛颖华,钟晓明. 维生素 C 和维生素 E 抗氧化机制及其应用的研究进展[J]. 吉林医学,2007,28(5):707 - 708.

[10] 张边江,唐 宁,杨 平,等. 镉离子和维生素 C 对果蝇寿命及抗氧化系统的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(1):76 - 78.

[11] 朱俊德,余资江,戈 果,等. 慢性镉中毒对小鼠学习记忆及海马 CA3 区的影响[J]. 环境与健康杂志,2009,26(7):576 - 579.

(编辑:周小林)