维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0619-04

高胆固醇血症促进淀粉样蛋白在铝中毒小鼠脑内沉积

李恒华,孙 峰,刘颖菊,高丽佳

(重庆医科大学药理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察高胆固醇血症对铝中毒致小鼠神经元损伤的促进作用。方法:小鼠给予铝 400mg/(kg·d)连续灌胃 10 周,实验第 3 周起改饲高胆固醇饮食至第 10 周末。结果:铝中毒组和铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠空间识别能力明显减退($P<0.05$),海马 CA1、CA2 区神经元明显损伤。与单纯铝中毒组相比,铝中毒联合高胆固醇饮食组血清总胆固醇明显升高($P<0.05$),小鼠空间识别能力下降程度和海马神经元损伤更明显,刚果红染色显示海马神经元损伤区出现淀粉样蛋白沉淀。结论:高胆固醇血症能加重铝中毒导致的神经元损伤,其机制可能跟促进淀粉样蛋白沉积有关。

【关键词】高胆固醇血症;淀粉样蛋白;铝

【中国图书分类法分类号】R749 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-27

Hypercholesterolemia accelerates the amyloid pathology in model mice induced by aluminum intoxication

LI Henghua, et al

(*Department of Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the aggravating effects of hypercholesterolemia on the damage to neurons induced by aluminum intoxication in mice. *Methods*: Aluminum was given by gavage with Al 400 mg/ (kg.d) for 10 weeks. Mice were placed on high-cholesterol diet the third week after Al was given. *Results*: The spatial recognition ability decreased significantly($P<0.05$) and hippocampal neurons (CA1, CA2)were damaged obviously in mice with aluminum and with or without high-cholesterol diet, compared with control group with basal diet. Moreover, the impairment of spatial recognition ability and the damage to neurons were more serious and pathological changes of amyloid in the hippocampus (CA1, CA2)with CR staining were found in mice with aluminum and high-cholesterol diet. *Conclusions*: Hypercholesterolemia may aggravate the damage to neurons induced by aluminum intoxication and its mechanisms might involve the acceleration of the amyloid deposition.

【Key words】Hypercholesterolemia; Amyloid; Aluminum

近年来越来越多的报道证实,胆固醇在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病机制中起着重要的作用[1],胆固醇可通过独立的或者与其它各种因素共同作用的方式诱发 AD。鉴于上述认识,本实验在铝盐灌胃的同时给予小鼠高胆固醇饮食,探讨高胆固醇血症对铝中毒致小鼠神经元损伤的促进作用,并期望建立一种新的更贴近人类的 AD 动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 NIH 小鼠,体重 18~21g,由重庆医科大学实验动物中心提供。将 80 只经过行为学实验筛选合格的小鼠随机分为普通饮食对照组、高胆固醇饮食组、铝中毒组、铝中毒联合高胆固醇饮食组,每组各 20 只,动物自由饮食,室温(23 ± 2)℃饲养。

1.2 药品与试剂

葡萄糖酸铝溶液由结晶三氯化铝($AlCl_3.6H_2O$)和葡萄糖酸钠($C_6H_{11}O_7Na$)按质量比 5.37g : 2.97g 溶于 30ml 水中,氢氧化钠调定 pH 值至 7.0 而成。结晶三氯化铝为上海金山区兴塔美兴化工厂产品,批号 030801-6;葡萄糖酸钠成都科龙化工试剂厂产品,批号 030124;胆固醇为北京鼎国生物技术有限责任公司产品,纯度达 99.5%;牛胆酸钠为北京奥博星生物技术有限公司产品,纯度达 70%以上。其它试剂均为分析纯,符合实验要求。

1.3 仪器

作者介绍:李恒华(1980-),女,硕士研究生,主要研究方向:神经药理学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Morris 水迷宫由中国医学科学院药物研究所提供;全自动生化分析仪(MoDular p800 型)为瑞士罗氏公司产品。

1.4 方法

1.4.1 小鼠给药方法 小鼠适应性饲养 1 周后,铝中毒组及铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠按铝 400mg/kg 灌胃给予,每日 1 次,连续 10 周。从第 3 周起,高胆固醇饮食组和铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠给予高胆固醇饲料喂养至第 10 周结束。高胆固醇饲料配方:参照国外高胆固醇饲料配方[2]改进:8%猪油、5%胆固醇、2%胆酸钠,饲料中再加入 5%葡萄糖增加粘合度。

1.4.2 小鼠血清总胆固醇(TC)测定 至第 10 周末,每组取 6 只小鼠去眼球取血约 1ml,低温离心(1500r/min)10min,取上清液,全自动生化分析仪检测各样本血清总胆固醇浓度。

1.4.3 小鼠空间识别能力测试 (Morris 水迷宫) 参照 Morris 水迷宫实验方法[3]测定小鼠空间识别能力。实验历时 5 天,每天训练 2 次,小鼠面向池壁入水,每次入水点相同,记录小鼠寻找并爬上平台所需时间(潜伏期),如果在 120s 内未找到平台,将其引至平台,潜伏期记录为 120s,每天取两次潜伏期平均值作为当天学习记忆成绩。最后 1 天(第 5 天)的平均潜伏期作为评价指标。

1.4.4 病理形态学观察 行为学实验结束后,每组取 6 只小鼠 4%多聚甲醛 PBS 液(0.01mol/L,pH=7.3)经心脏在体灌流固定,分离脑组织作石蜡包埋切片(6μm),分别作 HE 和刚果红染色,观察海马神经元病理形态学改变。刚果红染色具体步骤参考 Freudenthal 氏改良刚果红染色法[4]。

1.5 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.1 统计软件进行两组间 t 检验,多组间单因素方差分析。

2 结 果

2.1 高胆固醇饮食对小鼠血清总胆固醇水平的影响

高胆固醇饮食组和铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠血清总胆固醇水平较普通饮食对照组明显升高($P<0.05$),但两组间无显著性差异。与单纯铝中毒组相比,铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠在第 10 周末血清总胆固醇水平明显升高($P<0.05$,见表 1)。

表 1 高胆固醇饮食对小鼠血清总胆固醇水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	n	TC(mmol/L)
正常对照组(NC)	6	1.83±0.23
高胆固醇饮食组(Chol)	6	3.81±0.72*
铝中毒组(AL)	6	2.06±0.43
铝中毒+高胆固醇饮食组(AL+Chol)	6	4.90±2.40*#

*:$P<0.05$vs 正常对照组;#:$P<0.05$vs 铝中毒组

2.2 高胆固醇血症对小鼠空间识别能力的影响

通过小鼠第 5 天寻找平台潜伏期的变化看出,与普通饮食对照组相比,高胆固醇饮食组未见显著性差异($P>0.05$),而铝中毒组和铝中毒联合高胆固醇饮食组平均潜伏期显著延长($P<0.05$),说明小鼠空间识别能力明显降低;与单纯铝中毒组相比,铝中毒联合高胆固醇饮食组平均潜伏期延长,但未达显著性差异($P>0.05$,见表 2)。

表 2 高胆固醇血症对小鼠空间识别能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	n	潜伏期(s)
正常对照组	10	18.7±7.1
高胆固醇饮食组	10	20.2±8.8
铝中毒组	10	31.8±14.7*
铝中毒+高胆固醇饮食组	10	34.8±15.7*

*:$P<0.05$vs 正常对照组

2.3 高胆固醇血症对小鼠海马神经元病理形态改变的影响

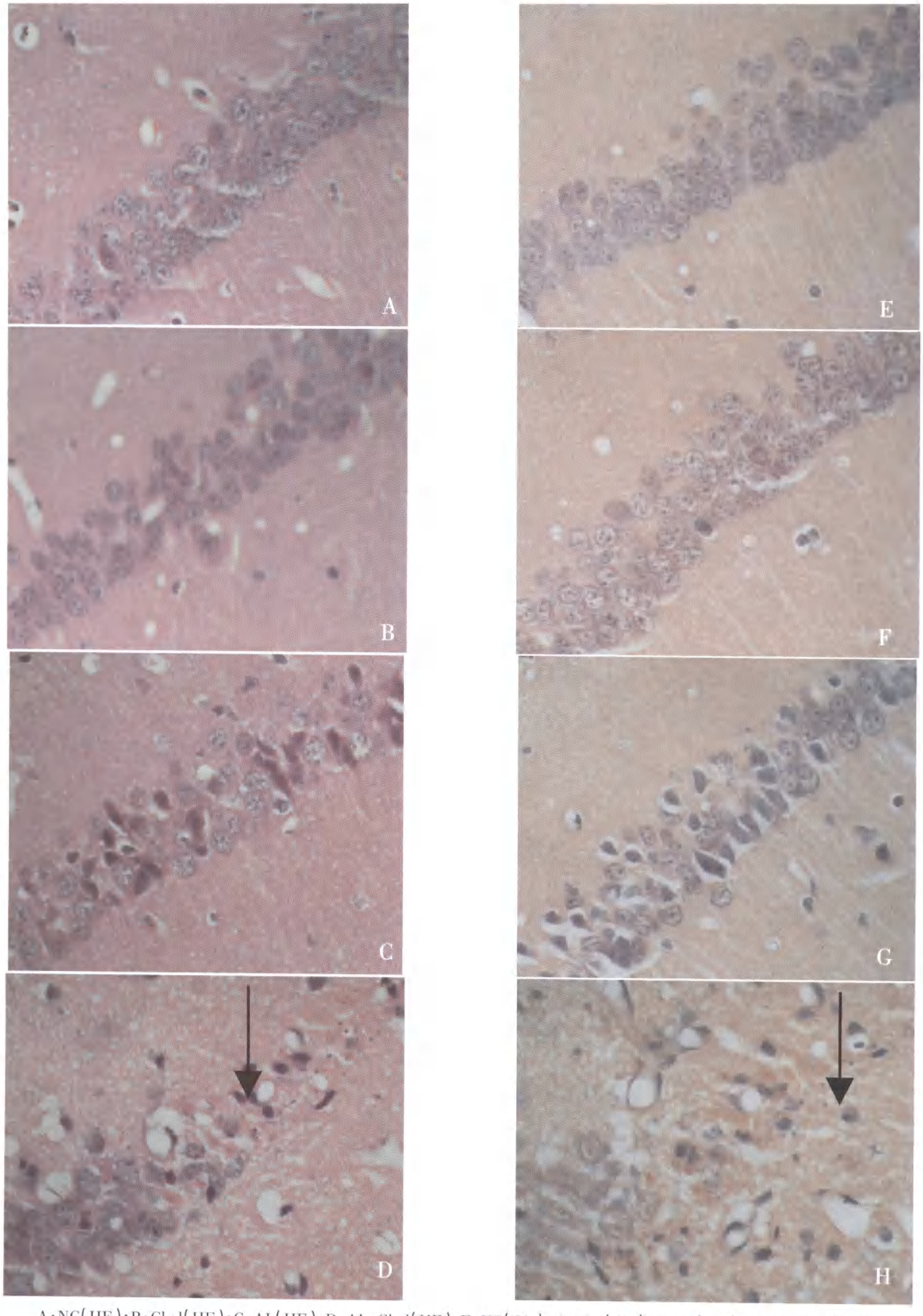
HE 染色后,光镜下观察小鼠海马 CA1~CA2 区神经元:普通饮食组和高胆固醇饮食组神经元数目多,分层清晰,排列整齐严密,核呈圆形,大而清晰,核仁明显。铝中毒组小鼠海马神经元数目减少,较多细胞核固缩,核深染。铝中毒联合高胆固醇饮食组神经元严重丢失,残留细胞核固缩,在变性坏死神经元周围出现散在的粉红色斑块样色素沉着物(见图 1A~D)。

Freudenthal 氏改良刚果红染色后,光镜下可见铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠海马 CA1~CA2 区坏死神经元周围有散在红色斑块,提示淀粉样蛋白沉淀物,而其余各组均未见类似改变(见图 1E~H)。

3 讨 论

拟 AD 的动物模型很多,但尚无一种模型能全面再现 AD 的症状和特征性病理改变。AD 发病机制复杂,为多种致病因素共同作用的结果,因此通过单一因素复制出的拟 AD 动物模型存在许多缺陷。铝中毒可引起动物出现类似 AD 样的认知功能障碍和神经元退行性变等[5],然而到目前为止,并未见到在铝中毒动物模型脑内复制出淀粉样蛋白沉淀的确切报道[6],而淀粉样蛋白沉淀是 AD 的主要病理改变之一。法国病理学家 Sparks 发现高胆固醇血症能促进淀粉样蛋白在兔脑内沉积[7],这个结果提

维普资讯 http://www.cqvip.com



A:NC(HE);B:Chol(HE);C:AL(HE);D:AL+Chol(HE);E:NC(CR);F:Chol(CR);G:AL(CR);H:AL+Chol(CR)

图 1　高胆固醇血症对小鼠海马神经元病理改变的影响(HE and CR)

维普资讯 http://www.cqvip.com

示胆固醇与 AD 发病密切相关，通过建立高胆固醇血症可在动物模型中复制出部分 AD 的特征性病理改变。

本实验中，行为学实验和 HE 染色结果显示，铝中毒组和铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠均出现空间识别能力下降，海马 CA1~CA2 区神经元病理损伤。铝中毒联合高胆固醇饮食组小鼠在血清总胆固醇水平较单纯铝中毒组明显升高的同时，空间识别能力更低，海马区神经元损伤更明显，不仅存在严重损伤，而且在变性坏死神经元周围出现散在的粉红色斑块样色素沉着物。经改良的刚果红染色后，发现在 HE 染色中呈粉红色的斑块样色素沉淀物在刚果红染色中呈红色改变，提示为淀粉样蛋白，而其它各组未见到类似病变。以上说明，高胆固醇血症能促进淀粉样蛋白在铝中毒小鼠脑内沉积并加重神经元损伤。但遗憾的是，所有标本的银染色均未发现神经纤维缠结样改变。

本实验结果还显示，单纯高胆固醇血症尚不能导致小鼠学习记忆功能障碍及神经元病理损伤。但有学者通过类似的实验研究发现，高脂血症能通过促进大鼠海马神经元内一氧化氮合酶(nNOS)的过表达，生成过量的 NO，导致海马神经元损伤的发生[8]。得出不同结果的原因可能跟各自采用的动物种属、实验时间长短和实验条件等不同有关。

综上所述，我们得出以下结论：高胆固醇血症能加重铝中毒导致的小鼠海马神经元损伤，其原因可能与促进淀粉样蛋白在小鼠脑内沉积有关，胆固醇、铝在 AD 的发病中可能存在协同作用。铝中毒联合高胆固醇血症两因素建立的拟 AD 模型可能更贴近人类 AD。

(通讯作者：刘颖菊，女，副教授，硕士生导师。E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Wellington CL. Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism[J].Clinical Genetics, 2004;66(1):1-16.

[2] Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, et al.Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol[J].J Biol Chem, 1998;273(26):16576-16582.

[3] Morris R.Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J].J Neurosci Methods, 1984;11(1):47-60.

[4] 刘介眉，严庆汉，路英杰，等，主编.病理组织染色的理论方法和应用[M].第 1 版，北京：人民卫生出版社，1983.149-231.

[5] Qian ZM, Shen X.Brain Iron transport and neurodegeneration [J].Trends Mol Med, 2001;7(3):103-108.

[6] Exley C.The aluminum -amyloid cascade hypothesis and Alzheimer's disease[J].Subcell Biochem, 2005;38:225-234.

[7] Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, et al.Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol[J].Exp Neurol, 1994;126(1):88-94.

[8] 柯红林，吴连仲，贾友苏.高脂血症大鼠海马nNOS 及 NT-3 免疫阳性神经元的变化[J].安徽医科大学学报，2004;39(3):177-181.

(上接第 583 页)

CD_{34}^+细胞明显高于单用 G-CSF 或 GPS 组。提示 GPS 动员后分离的外周血 MNC 悬液中含有较多的 HSPC，GPS 与 G-CSF 联合应用有协同作用，其机制是否为 G-CSF 先促进骨髓中 HSPC 的增殖，再与 GPS 协同驱使 HSPC 进入外周血尚不清楚。经 GPS 动员的小鼠外周血 CD_{34}^+细胞活性如何？我们通过体外培养外周血 CFU-Mix 集落来反映细胞群中早期 HSPC 的数量和活力，实验结果表明：GPS 动员后外周血 MNC 能形成较多的 CFU-Mix 集落，其 CFU-Mix 集落形成能力与 G-CSF 组无明显差异；G-CSF+GPS 联合动员后 CFU-Mix 产率高于单用 GPS 组，此结果进一步证明 GPS 能动员小鼠骨髓 HSPC 进入外周血，且与 G-CSF 有协同作用。由于造血重建能力是造血干细胞的唯一可靠标志[5]，我们将进一步研究 GPS 动员的造血干细胞对骨髓抑制小鼠的造血重建功能以及 GPS 动员的可能机制。

参 考 文 献

[1] 陈岩菊，杜伟彬，李树臣.人参多糖在肿瘤放射治疗中升白细胞观察[J].中医药学报，2004;32(2):55-56.

[2] 戴 勤，王亚平，周开昭，等.人参多糖对粒单系造血祖细胞增殖分化的影响[J]. 基础医学与临床，2004;24(1):52-55.

[3] 刘秀珍.造血祖细胞培养技术实验手册[M].北京：北京出版社，1993.118-127.

[4] Bunting KD.ABC transporters as phenotypic makers and functional regulators of stem cells[J].Stem Cells, 2002;20(1):11-20.

[5] Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, et al.A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity [J]. Nature Med, 1998;4(9):1038-1045.