维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)02-0125-04

铝过负荷致小鼠脑神经元退变与脑单胺氧化酶 B 的关系

吴 柯,周歧新

(重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用铝负荷致小鼠脑损伤模型,探讨铝致神经元退行性变与脑单胺氧化酶 B 代谢失衡的关系。方法:每鼠侧脑室内分别注射浓度为 0.125%、0.25%、0.5%的 $AlCl_3$ 3μl,连续给药 5 天,建立不同量铝过负荷致脑损伤小鼠模型。于给药后第 10 天、第 20 天和第 30 天测定小鼠学习记忆功能、海马病理形态学改变、单胺氧化酶 B(Monoamine oxidase B,MAO-B)活性。结果:铝过负荷致小鼠脑内 MAO-B 活力显著升高和 CA1 区出现明显神经元丢失及核固缩;上述指标均呈剂量依赖性和时间依赖性改变。结论:铝过负荷致神经元退变可能与其干扰脑单胺氧化酶 B 代谢有关。

【关键词】铝过负荷;神经元退变;MAO-B

【中国图书分类法分类号】R994.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-11

Correlation between aluminum overload-induced brain neurodegeneration and monoamine oxidase B in mouse brain

WU Ke, et al

(*Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To adopt the brain lesion model of mouse induced by overload aluminum to study the relationship between monoamine oxidase B disorder and neurodegeneration induced by overload aluminum (Al). *Method*: Aluminum overload models were established by injection of 3μl AlCl3 into lateral ventricle of miceeach day for 5d. The AlCl3 solutions injected in different modelswere with different concentrations and they were 0.125%, 0.25%, 0.5%. On d10, d20, and d30 after the final administration of AlCl3 solution, the learning and memory function of mice, pathomorphology of hippocampi, and MAO-B activity were determined. *Results*: Aluminum overload elevated MAO-B activity, caused karyopyknosis and loss of neurons in CA1 area of hippocampi, in dose-and time-dependent manners. *Conclusion*: The results indicate that neurodegeneration induced by Al toxicity may be related to the monoamine oxidase B homeostasis interfered by Al overload.

【Key words】Aluminum overload; Neurodegeneration; Monoamine oxidase B(MAO-B)

铝约占地壳的 8%,是地球上含量最丰富的元素之一。在人们的日常生活中,从水的供给到各种食品和药品的包装都离不开铝。因此,不可避免地我们每天都在摄入铝或含铝的物质[1]。虽然铝的神经毒性早已引起广泛的注意,但铝致神经元退变性疾病的机理却仍未完全阐明。鉴于铝中毒涉及学习记忆障碍[1]和有文献报道 Alzheimer's 病人脑内单胺氧化酶活性明显升高[2],故推测铝的神经毒作用可能与影响脑单胺氧化酶 B 的代谢有关[3,4];但这种关系尚缺乏充分的直接证据。目前,铝负荷动物模型多采用口服或腹腔注射铝盐建立,建模周期为 3~6 月。为缩短实验周期,我们通过向小鼠侧脑室定位注射微量铝盐可在 1 月内建立铝负荷致神经元损伤模型;并以此模型研究铝致神经元退行性变与脑单胺氧化酶 B 代谢的关系,期望从另一个视角探讨铝负荷致神经毒性的可能机制。

作者介绍:吴 柯(1978-),男,硕士,主要研究方向:药理学。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂

雄性 I 级 NIH 小鼠 180 只,24~28g,重庆医科大学实验动物中心提供。三氯化铝六水合物,国产分析纯,批号 990517-3。MAO-B 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 $AlCl_3/Al(OH)_3$ 胶体溶液配制

称取 4472mg 六水三氯化铝,溶于少量双蒸水中,在 60℃

维普资讯 http://www.cqvip.com

水浴中边摇边用 0.1mol/L NaOH 溶液滴定到 pH6.5 左右，加双蒸水定容到 100ml，得含铝为 0.5%的溶液（以 Al^{3+} 计算）。分别取 30ml、20ml 用双蒸水定容到 60ml 和 80ml 得到含铝为 0.25%、0.125%溶液。溶液新鲜配制，用前高压灭菌。

1.3 脑室埋管及给药方法

参照 Toyoda 法制作不锈钢导管和塑料内芯[5]。小鼠 ip 4%水合氯醛溶液 10ml/kg 麻醉，俯卧于手术台上，在中线右侧旁 1.3mm、前囟后 0.3mm 处择点钻孔（右侧），垂直插入导管 2mm，固定。术后小鼠休息 1 周后，随机分为 12 组（设 3 个时间点，每个时间点设对照组和 3 个铝负荷组），每组 15 只。清醒状态下分别脑室内注射 0.125%、0.25%、0.5% $AlCl_3$/Al(OH)$_3$ 胶体无菌溶液 3μl，对照组给予双蒸水 3μl，连续给药 5 天。给药时拔出导管内芯，将连接于微量注射器上自制的合适口径针管插入导管（针管下端超出导管下缘 0.5mm 以内），缓慢推注，给药完后留针 3min，取出针管并塞好内芯。

1.4 学习记忆能力测试

空间学习记忆能力测试：用 SIG-2 电脑全自动程控小鼠水迷宫（中国医学科学院药物研究所研制）测定空间学习记忆能力。于 5 天给药计划完成后 5 天、第 15 天和第 25 天，参照文献报道[6]并作适当修改训练小鼠：每组小鼠每天共训练 6 次，上下午各 3 次，每次限时 180s，间隔休息 10min，连续 5 天，第 6 天上午进行记忆能力测试，潜伏期上限定为 180s，超过 180s 仍未找到平台者其潜伏期记为 180s。

被动回避学习记忆能力测试：于给药后第 9 天，第 19 天和第 29 天晚上 9 点以后进行。采用 WCX-2 型跳台仪（中国医学科学院药物研究所研制）测定小鼠被动回避学习记忆能力：将小鼠放入跳台仪的测试室，让其熟悉环境 3min，然后接通 36V 交流电，持续 10min 后取出小鼠。24h 后进行记忆测试，将小鼠头朝跳台仪壁放在跳台上，记录小鼠下台时间（潜伏期），300s 不下台记为 300s。待小鼠完成行为学测试后，处死小鼠，取脑，进行病理切片观察和各项生化指标检测。

1.5 在体灌注固定及切片制备

每组取小鼠 4 只麻醉并固定。剪开胸腔，暴露并剪破右心耳，用 4# 头皮针经心尖刺入左心室，快速推入肝素磷酸缓冲液 30ml（2000U/L），然后缓慢推入 4%多聚甲醛固定液 40~50ml，最后分离全脑并用 10%甲醛固定 24h。常规石蜡切片，HE 染色。普通光镜下观察小鼠海马病理形态学改变情况。

1.6 单胺氧化酶 B 活力测定

每组取小鼠 6 只，断头处死。分离全脑并在冰面上快速分离出海马，用 4℃生理盐水制成 10%匀浆。按 MAO-B 试剂盒说明书操作，测定 MAO-B 活力。

1.7 脑组织中铝离子含量测定

每组取 5 只小鼠，断头处死，分离全脑并称重，加入 2ml 双蒸水，匀浆，按 8ml/g 脑重（湿重）加入 25%四乙基氢氧化铵溶液，80℃消化 24h 至溶液澄清，加双蒸水定容到 10ml，测定时用双蒸水稀释 5 倍。为了避免金属离子的干扰，所有过程均采用一次性塑料试管。采用等离子体原子发射光谱分光光度仪（Plasma400，美国 PE 公司）进行测定，测定波长为：铝 309.3nm。

1.8 数据统计

所有数据以均数 ± 标准差表示，组间比较使用 F 检验进行统计处理。

2 结 果

2.1 铝负荷对小鼠学习记忆能力的影响

表 1 显示，铝负荷组小鼠学习记忆能力较对照组明显下降，表现为跳台实验中下台潜伏期缩短，水迷宫实验中寻台时间延长，且与铝负荷呈剂量和时间依赖性变化。提示铝负荷明显损伤小鼠的被动学习记忆能力和空间学习记忆能力。

2.2 铝负荷对小鼠海马病理形态学的影响

与溶剂对照组相比，铝负荷 d30 的小鼠海马 CA1 区出现不同程度的剂量依赖性神经元核固缩和神经细胞丢失（见图 1）。

A：假手术组：神经元核膜、核仁清晰，细胞形态完整，排列整齐。B：0.125%$AlCl_3$ 组和 C：0.25% $AlCl_3$ 组：可见一些神经细胞丢失和核固缩现象，并且神经元在 CA1 区排列杂乱。D：0.5% $AlCl_3$ 组：可见严重的神经细胞丢失和核固缩现象，并且神经元排列紊乱。

2.3 铝负荷对小鼠脑单胺氧化酶 B 活力的影响

表 1 铝过负荷对小鼠学习和记忆能力的影响

Al^{3+}(%)	潜伏期(s)			寻台期(s)		
	d10	d20	d30	d10	d20	d30
模型组	296 ± 10	297 ± 11	281 ± 9	11 ± 9	13 ± 9	14 ± 9
0.125	277 ± 32	222 ± 35*	71 ± 22**	25 ± 12	83 ± 36**	68 ± 45**
0.25	120 ± 64*	130 ± 74*	65 ± 47**	51 ± 19*	107 ± 62**	133 ± 46**
0.5	89 ± 53*	63 ± 11*	25 ± 21**	68 ± 38*	145 ± 31**	141 ± 55**

$\bar{x} \pm s$，$n=15$. $^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$ *vs* 模型组

维普资讯 http://www.cqvip.com

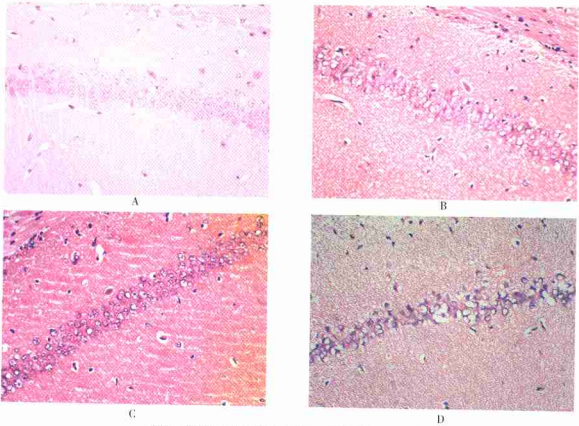


图 1 铝过负荷对小鼠海马神经元的影响(HE×400)

表 2 铝过负荷对小鼠海马单胺氧化酶 B 活力的影响

单位:U/mg protein(n=6,$\bar{x}\pm s$)

	模型组	0.125% $AlCl_3$	0.25% $AlCl_3$	0.5% $AlCl_3$
10d	1.16±0.31	0.68±0.20	0.90±0.20	1.13±0.04
20d	1.32±0.29	7.94±0.01	8.02±0.17	7.94±0.01
30d	1.65±0.34	2.38±0.94*	3.76±0.85**	4.34±1.20**

*$P<0.05$ and **$P<0.01$ *vs* 模型组

表 3 铝过负荷对小鼠皮质单胺氧化酶 B 活力的影响

单位:U/mg protein(n=6,$\bar{x}\pm s$)

	模型组	0.125% $AlCl_3$	0.25% $AlCl_3$	0.5% $AlCl_3$
10d	1.04±0.34	0.92±0.12	0.98±0.48	0.93±0.52
20d	1.08±0.36	7.93±0.01	7.94±0.01	7.94±0.01
30d	1.14±0.37	2.90±0.66*	3.24±0.98**	3.70±0.57**

*$P<0.05$ and **$P<0.01$ *vs* 模型组

表 4 铝过负荷对小鼠纹状体单胺氧化酶 B 活力的影响

单位:U/mg protein(n=6,$\bar{x}\pm s$)

	模型组	0.125% $AlCl_3$	0.25% $AlCl_3$	0.5% $AlCl_3$
10d	1.36±0.41	1.20±0.32	1.03±0.45	1.27±0.63
20d	1.87±0.38	7.94±0.01	7.94±0.01	7.94±0.01
30d	1.22±0.33	2.47±0.32**	2.79±0.46**	3.13±0.87**

*$P<0.05$ and **$P<0.01$ *vs* 模型组

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 铝负荷小鼠脑铝水平

Al^{3+}(%)	Al(μg/g 脑重)		
	d10	d20	d30
模型组	31.0 ± 1.4	27.9 ± 1.5	34.1 ± 1.3
0.125	43.0 ± 2.1*	42.5 ± 2.1*	34.5 ± 1.0
0.25	63.0 ± 8.7**	62.0 ± 9.6**	53.0 ± 6.0**
0.5	101.0 ± 13.0**	86.0 ± 2.4**	65.0 ± 1.1**

$x \pm s$, $n=5$ $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* 模型组

结果见表 2、3、4。显示铝过负荷小鼠各脑区在 30 天时 MAO-B 活性明显高于相应的对照组。提示铝过负荷可致海马、皮质、纹状体单胺能神经元代谢异常。

2.4 铝负荷对小鼠脑组织中铝影响

与相应对照组相比,铝负荷小鼠脑铝水平呈剂量依赖性增加和呈时间依赖性降低;低铝负荷组小鼠在停止给铝第 30 天后脑铝水平已接近正常。(表 5)

3 讨 论

众所周知,铝具有明显的神经毒性,但具体机制却是众说纷纭。本研究采用脑室内微量注射三氯化铝建立铝负荷模型,研究铝负荷致脑损伤与脑单胺氧化酶 B 代谢的关系,从铝对单胺氧化酶 B 影响角度探讨铝的神经毒性机制。本研究结果显示,铝负荷后脑铝水平呈时间依赖性降低,提示脑组织清除有害物铝的功能仍然保持。但病理切片检查显示,以海马神经元核固缩和神经元丢失为特点的神经退行性变呈铝负荷剂量依赖性和时间依赖性加重;同时,小鼠被动回避能力和空间定向能力均受损(跳台潜伏期明显缩短,水迷宫寻台时间显著延长)。提示铝负荷对神经元的损伤可能是启动某个尚未了解的机制,而后者促成了神经元持久的退行性变过程。

本实验结果显示,铝负荷致小鼠脑内 MAO-B 活力明显升高,提示 MAO-B 表达增强可能与铝负荷致神经元退行性变有关。MAO-B 是一种线粒体膜复合酶,在多巴胺的代谢途径中发挥重要作用;可将多巴胺降解为二羟苯乙酸,同时生成过氧化氢,过氧化氢与二价铁经 Fenton 式反应形成高活性的羟自由基可对神经元产生毒性作用。MAO-B 也能氧化 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine),后者是一种能够诱导 PD(Parkinson's disease)的化学物质。MPTP 的神经毒作用主要是 MPTP 通过 MAO-B 催化反应生成的 1-甲基 4-苯基-吡啶盐离子(MPP^{+})。已证明有老年斑存在的 AD(Alzheimer's disease)患者星状细胞中 MAO-B 水平升高,脑回内 MAO-A 和 MAO-B 的 mRNA 明显升高[7];放射性酶法行尸检发现 AD 患者前额皮质 MAO-B 活性比正常者升高 16%[8];放射法发现 ALS(Amyotrophic lateral sclerosis)患者脊柱匀浆中 MAO-B 活性显著升高;体外定量放射自显影技术行尸检发现 ALS 患者的皮质脊髓通路、运动神经元区域和腹白质的 MAO-B 显著升高[9];尸检发现亨廷顿病(Huntingtons disease,HD)患者尾状核内 MAO-B 活性比对照组升高 260%,额叶皮质内 MAO-B 活性较对照组升高 26%;HD 患者血小板 MAO 活性较正常对照者显著升高,而血小板中的 MAO 只有 MAO-B 一种。铝过负荷小鼠痴呆模型和一氧化碳中毒致小鼠痴呆模型中也发现 MAO-B 活性升高[10,11],而且 MAO-B 基因敲除的小鼠对致 PD 神经毒素 MPTP 具有耐受性[12]。而 MAO-B 抑制剂对某些神经元退行性变疾病有一定治疗作用[13]。这些结果均提示 MAO-B 活力升高与神经元退变性疾病相关。

基于以上分析,作者认为铝过负荷致神经元退变可能与其干扰 MAO-B 代谢有关。有文献报道[10],铝过负荷可致小鼠脑内铁离子增高。而铁的螯合剂明显降低 MAO-B 的活性;二价铁或三价铁可部分或全部逆转由 MAO-B 抑制剂所导致的 MAO-B 活性降低[13,14]。提示在铝负荷中出现的铁水平增高与 MAO-B 活性增高之间应有某种联系,即铁过量可导致 MAO-B 活性增高。

(通讯作者:周歧新 E-mail:cqzhouqx@yahoo.com.cn;Tel:023-68485322)

参 考 文 献

[1] Carpenter DO.Effects of metals on the nervous system of humans and animals[J].Int J Occup Med Environ Health,2001;14(3):209-218.

[2] Kennedy BP,Ziegler MG,Alford M,et al.Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO A and B in Alzheimer's disease [J].Neural Transm,2003;110(7):789-801.

[3] Huh JW,Choi MM,Lee JH,et al. Activation of monoamine oxi-

(下转第 133 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

MS+非 IR-NGT 组和 MS+非 IR-高血糖组的 Homa-IR 水平无差别，而 Homa-β 和 DI 指数依次减低，差别具显著性。提示即使在糖耐量正常的不伴 IR 的 MS 人群仍具有胰岛 β 细胞功能减退。这可能与脂毒性尤其是高游离脂肪酸血症通过多种途径促使 β 细胞分泌功能衰退有关。

综上所述，在 MS 人群中，并非所有患者均伴 IR，不伴 IR 的 MS 患者合并代谢紊乱的成份较少、程度较轻。无论伴或不伴 IR、糖耐量正常与否，MS 患者均存在胰岛 β 细胞功能减退。

参 考 文 献

[1] 陈蕾，贾伟平，陆俊茜，等.上海市成人代谢综合征流行调查[J].中华心血管病杂志，2003；31(12)：909-912.

[2] Hanley AJ，Wagenknecht LE，D'Agostino RB Jr，et al. Identification of subjects with insulin resistance and β-Cell dysfunction using alternative definitions of the metabolic syndrome[J].Diabetes，2003；52(11)：2740-2747.

[3] International Diabetes Federation (2005)：The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome[EB/OL].http://www.idf.org/webcast/pdf/IDF_Back-grounder_3.pdf.

[4] Albareda M，Rodriguez-Espinosa J，Murugo M，et al. Assessment of insulin sensitivity and beta-cell function from measurements in the fasting state and during an oral glucose tolerance test[J].Diabetologia，2000；43(12)：1507-1511.

[5] International Diabetes Federation (2005)：The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome[EB/OL].http://www.idf.org/webcast/pdf/IDF_Back-grounder_1.pdf.

[6] Ford ES，Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions[J].Diabetes Care，2003；26(3)：575-581.

[7] 陈 蕾，贾伟平，项坤三，等.应用扩展葡萄糖钳夹技术检测机体胰岛素敏感性[J].中国糖尿病杂志，2001；9(增刊 1)：35-36.

[8] Savage DB，Petersen KF，Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammationa[J].Hypertension，2005；45(5)：828-833.

[9] DeFronzo RA，Ferrannini E. Insulin resistance：a multifaceted syndrome responsible for NIDDM，obesity，hypertension，dyslipidemia，and atherosclerotic cardiovascular disease [J].Diabetes Care，1991；14(3)：173-194.

[10] Haffner SM，Miettinen H，Stern MP.The homeostasis model in the San Antonio Heart Study[J].Diabetes Care，1997；20(7)：1087-1092.

[11] Bergman RN，Phillips LS，Cobelli C.Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man [J].J Clin Invest，1981；68(12)：1456-1467.

(上接第 128 页)

dase isotypes by prolonged intake of aluminum in rat brain [J].Inorg Biochem，2005；99(10)：2088-2091.

[4] Zatta P，Zambenedetti P，Milanese M.Activation of monoamine oxidase type-B by aluminum in rat brain homogenate[J].Neuroreport，1999；10(17)：3645-3648.

[5] Toyoda M，Satio H，Matsuki N.Nitric oxide but not carbon monoxide is involved in spatial learning of mice[J].Jpn J Pharmacol，1996；71：205-211.

[6] Zhang JT，Zai T.Damage the passive avoidance ability by 12 a gents step down test and dark avoiding test[J].Acta Pharmacol Sin，1986；21(1)：12-19.

[7] Emilsson L，Saetre P，Balciuniene J，et al.Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex o-fAlzheimer's disease patients[J].N eurosci Lett，2002；326(1)：56-60.

[8] KennedyBP，ZieglerMG，AlfordM，et al.Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO A and B in Alzheimer's disease [J].J N eural Transm，2003；110(7)：789-801.

[9] Jossan SS，Ekblom J，Aquilonius SM，et al.Monoamine oxidase-B in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis studied by quantitative autoradiography[J].J N eural Transm Suppl，1994；41：243-248.

[10] 何百成，滕永真，杨俊卿，等.铝过负荷致小鼠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.

[11] Yang JQ，Zhou QX.Protect effect of nimodipine on cerebral in jury induced by carbon monoxide poisoning in mice[J].Industrial health and occupational diseases，2001；27(1)：19-22.

[12] Shih JC，Chen K.MAO-A and-B gene knock-out mice exhibit distinctly different behavior[J].N eurobiology(Bp)，1999；7(2)：235-246.

[13] Youdim MB，Fridkin M，Zheng H.Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases[J].Mech Ageing De，2005；126(2)：317-326.

[14] Youdim MB，Fridkin M，Zheng H.Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases[J].J Neural Transm，2004；111(10-11)：1455-1471.