维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0547-05

铝过负荷致小鼠神经退行性变与氧化应激和抗氧化应激系统关系的研究

邱红梅,何百成,周歧新

(重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究铝过负荷致小鼠神经元退行性变与脑内氧化应激系统和抗氧化应激系统之间的关系。方法:采用氯化铝溶液(相当于 400 mg/kg Al^{3+})灌胃小鼠,每天 1 次,1 周 6 天,连续 3 月,建立铝过负荷所致小鼠神经元退行性变模型。以被动回避性学习记忆能力和空间识别能力的改变、大脑皮层和海马总 SOD、SOD2 活性和 MDA 含量变化、以及海马病理学改变为观察指标。结果:铝过负荷能明显导致小鼠进行性被动回避性学习记忆和空间识别能力障碍;出现海马神经元核固缩和神经元丢失;脑组织总 SOD 和 SOD2 活性及 MDA 含量呈平行变化,出现先升高后降低趋势,但各时点 SOD 和 SOD2 活性及 MDA 含量均明显高于对照组。结论:铝过负荷明显致小鼠神经元退行性变,学习记忆能力下降。其机制可能与铝负荷引起脑内氧化应激反应和抗氧化应激系统动员失恒有关。

【关键词】铝过负荷;神经系统退行性改变;SOD;SOD2;MDA

【中国图书分类法分类号】R964 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-07

Study of the relationship between aluminum overload-induced neurodegeneration and systems of oxidative stress and anti-oxidative stress in mice

QIU Hongmei , et al

(Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical Vmversity)

【Abstract】*Objective*: To study the roles of the oxidative stress system and the anti-oxidative stress system in neurodegenerative processes induced by aluminum overload in mice. *Methods:* The neurodegenerative model of mice was established via intragastric administration of $AlCl_3$ solution (element aluminum 400 mg/kg) once a day, with 6 days of week for 3 months. The light-dark test and morris-water-maze were used to evaluate the learning and memory functions. The activities of SOD and SOD2 as well as the contents of MDA in both cortices and hippocampi were measured. Pathomorphological changes of hippocampi were observed. *Results:* Aluminum overload significantly decreased capacity of passive avoidance learning and memory and spatial recognition, caused the pyknosis and neuron loss of hippocampi, and parallelly increased SOD and SOD2 activities as well as MDA content in cortex and hippocampi, with a tendency of raising first and then gradually decreasing. *Conclusions:* Aluminum overload markedly causes neurodegeneration and damages learning and memory function in mice, the mechanism of which may be related to the imbalance between oxidative stress and anti-oxidative stress systems in brain induced by aluminum overload.

【Key words】 Aluminum overload; Neurodegeneration; SOD; SOD2; MDA

铝是一种慢性神经毒性物质,使神经系统发生退行性改变。动物实验以及流行病学调查均证实铝引起学习记忆及认知能力障碍[1,2]。一般认为,脑内脂质过氧化反应增强,超氧阴离子和自由基(主要产生部位在线粒体)生成加速,脂质过氧化产物如 MDA 增加,是其神经毒机制之一。然而脑内也存在抗氧化应激系统,其作用是清除脑内的超氧阴离子和自由基。这些抗氧化应激酶系的表达随年龄进程和脑内脂质过氧化程度而增加[3],以对抗氧化应激机制增强。问题是在许多情况下,这些抗氧化应激的酶系的表达增加为什么不能有效遏制氧化应激所致的神经元退行性变?为此,本试验采用慢性经胃肠道给予铝中毒模型[4],观察铝过负荷致神经元退行性变的时间过程,分析脑内氧化应激,脂质过

作者介绍: 邱红梅(1978-),女,助教,硕士,主要研究方向:神经药理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

氧化反应与抗氧化应激酶系表达在神经元退行性变过程中的作用。希望能找到他们之间的有机内在联系。

1 材料与方法

1.1 动物

NIH 小鼠，雌雄各半，体重 20～25 g，由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 药品及试剂

$AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 和葡萄糖酸钠为国产分析纯，临用前用蒸馏水配制成 45%溶液；SOD、MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。

1.3 仪器

WCX-2 型小鼠跳台仪，小鼠明暗刺激仪和 SIZ-2 型电脑全自动程控水迷宫（中国医学科学院药物研究所研制），台式高速冷冻离心机（Sigma），UV-260 紫外分光光度计（日本）。

1.4 方法

1.4.1 分组

NIH 小鼠 140 只，随机分成模型组和对照组各 70 只，模型组每天灌胃（ig）给予 45%葡萄糖酸铝 0.2ml/10 g 体重（相当于 400mg/kg），对照组 ig 给予等体积溶剂，1 周给予 6 天，连续给予 3 月。于给药 1 周、2 周、3 周、1 月、1.5 月、2 月、3 月 7 个时间点测定小鼠学习记忆功能、皮层和海马 MDA 水平和 SOD 及 SOD2 活性，并观察海马病理形态学变化。

1.4.2 行为学测试

1.4.2.1 小鼠避暗实验[5] 各组分别取动物 5 只，头部向外放入避暗实验盒中，暗室内底部栅板通电（AC,36 V），记录小鼠从明室进入暗室遭受电刺激所需时间（潜伏期）和设定时间内遭受电击次数（错误次数）；24h 后，重复以上实验，观察小鼠记忆获得情况。

1.4.2.2 水迷宫实验 用 Morris 水迷宫进行小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，将小鼠放到平台上适应 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，将小鼠面向池壁放入水中，让小鼠进行定向航行，持续训练 4 天；第 2 阶段，即在第 5 天时进行测试，撤去平台，并任意将小鼠从最后 1 次训练时的入水方位放入，电脑记录小鼠第 1 次跨越原平台的时间，即潜伏期（超过 3 min 以 3 min 计算）。

1.4.2.3 小鼠自发活动测定[6] 动物的自发活动标志着动物中神经系统的兴奋状态，当中枢神经系统兴奋时，自发活动加强。抑制时则减少。各组分别取小鼠 5 只放入小鼠自发活动程序自动控制仪中，记录小鼠自发活动次数。

1.4.4 脑组织 SOD 活性和 MDA 含量测定

在完成全部行为学测试后，处死小鼠，分离海马和皮层，用生理盐水做成 10%(w:v)的匀浆，以 Doumas 法测定蛋白量。按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书要求的操作步骤，以黄嘌呤酶法测定 SOD 活力，以硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

1.4.4 脑组织病理形态学观察[7]

小鼠用水合氯醛麻醉，用含 5%甲醛和肝素的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)进行经心脏在体灌流和脑组织固定。完整分离脑组织，保存在固定液中 2~7 天。脑组织冠状切面切片、HE 染色镜检。

1.4.5 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件包进行单因素方差分析，组间差异采用 Dunnett 方法检验。

2 结 果

2.1 铝过负荷对小鼠避暗实验的影响

结果见表 1。显示与对照组小鼠相比，模型鼠呈时间依赖性潜伏期明显缩短，而受电刺激次数明显增多。提示铝负荷致小鼠被动学习记忆能力进行性下降。

2.2 铝过负荷对小鼠水迷宫实验的影响

结果见图 1。显示与对照组小鼠相比，铝负荷 1.5 月后，小鼠寻台时间基本呈时间依赖性明显延长，但各时间点对照组寻台时间相比无显著性差异。提示铝负荷致小鼠空间识别能力进行性降低。

2.3 铝过负荷对小鼠自发活动的影响

结果见图 2。显示铝负荷对小鼠自发活动能力无显著性差异。

2.4 铝过负荷对小鼠脑组织蛋白含量的影响

表 1 铝过负荷对小鼠避暗实验潜伏期和错误次数的影响（n=10，$\bar{x} \pm s$）

		1周	2周	3周	1月	1.5 月	2月	3月
Latency (sec)	control	275.2 ± 30.1	273.1 ± 44.4	286.4 ± 12.9	230 ± 35.6	270.5 ± 37.2	265.6 ± 29.6	286.4 ± 24.5
	model	273.9 ± 29.6	243.4 ± 86.1	225.8 ± 76.2	176.25 ± 23.44**	78 ± 22.2**	48.8 ± 17.1**	19.5 ± 12.4**
The frequency	control	1.125 ± 0.83	1 ± 0.76	1.125 ± 0.99	0.875 ± 0.83	1 ± 0.76	0.875 ± 0.83	0.875 ± 0.83
of error	model	1.25 ± 1.0	1.13 ± 0.83	1.25 ± 1.04	2.125 ± 0.83**	2.25 ± 0.64**	3 ± 0.97**	3.875 ± 0.99**

注：与相应对照组比，**P<0.01。

维普资讯 http://www.cqvip.com

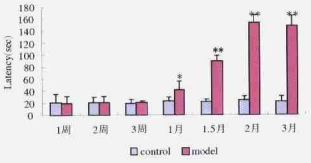


图 1 铝过负荷对小鼠水迷宫寻台时间的影响

注：与相应对照组比，**P<0.01，*P<0.05。

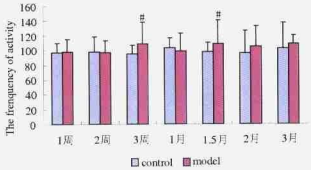


图 2 铝过负荷对小鼠自发活动次数的影响

注：与相应对照组比，#P>0.05。

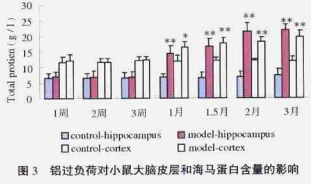


图 3 铝过负荷对小鼠大脑皮层和海马蛋白含量的影响

注：与相应对照组比，**P<0.01，*P<0.05。

结果见图 3。显示铝负荷 1.5 月后，小鼠大脑皮层和海马蛋白含量呈时间依赖性持续升高。提示铝负荷致小鼠学习记忆损伤的同时，还诱导某些基因表达和蛋白质合成显著增加。

2.5 铝过负荷对小鼠脑组织 SOD 活性的影响

结果见图 4，图 5。显示铝过负荷 1.5 月后，小鼠大脑皮层和海马单位蛋白 SOD 及 SOD2 活性均显著性升高，以负荷 2 月升高最明显，3 月出现下降但仍高于正常水平。

2.6 铝负荷对小鼠脑组织 MDA 水平的影响

结果见图 6。显示铝过负荷 1.5 月后，小鼠皮层和海马 MDA 水平呈明显升高。而对照组各时间点

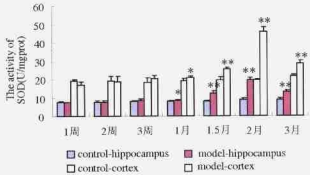


图 4 铝过负荷对小鼠大脑皮层和海马 SOD 活性的影响

注：与相应对照组比，**P<0.01，*P<0.05。

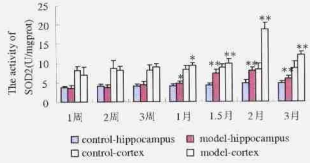


图 5 铝过负荷对小鼠大脑皮层和海马 SOD2 活性的影响

注：与相应对照组比，**P<0.01，*P<0.05。

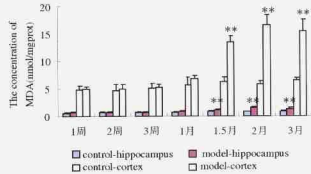


图 6 铝过负荷对小鼠大脑皮层和海马 MDA 含量的影响

注：与相应对照组比，**P<0.01。

皮层和海马 MDA 水平无明显差异。

2.7 铝过负荷对小鼠海马病理形态学的影响

结果见图 7。对照组显示各时间点海马区域神经细胞排列紧密，层次分明，细胞形态清晰。铝过负荷组细胞从 1.5 月开始随铝负荷时间的延长显示海马区细胞核固缩、碎裂和细胞丢失。

3 讨 论

目前，全球正步入老龄化社会，越来越多的老龄

维普资讯 http://www.cqvip.com

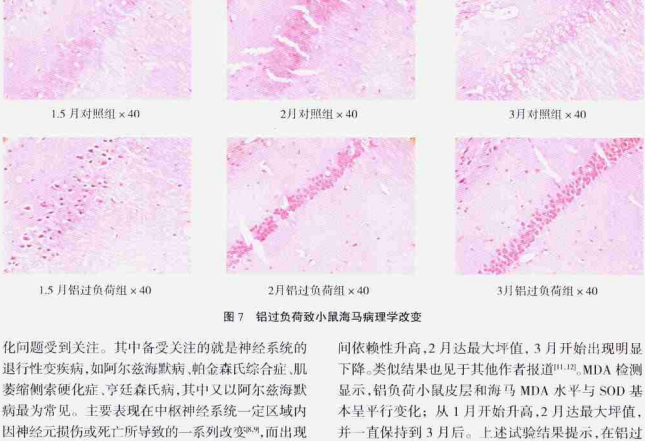


图 7　铝过负荷致小鼠海马病理学改变

化问题受到关注。其中备受关注的就是神经系统的退行性变疾病，如阿尔兹海默病、帕金森氏综合症、肌萎缩侧索硬化症、亨廷森氏病，其中又以阿尔兹海默病最为常见。主要表现在中枢神经系统一定区域内因神经元损伤或死亡所导致的一系列改变[8,9]，而出现不同临床症状。迄今为止，引起这些退行性改变的原因尚未十分清楚。铝是地壳中含量最丰富的元素之一。小鼠自由摄入含铝离子的水 10 周可导致神经系统炎症和神经元退行性改变[8]。我们以前的小鼠脑室内微量铝注入实验，也成功建立铝负荷致小鼠学习记忆障碍模型[10]。鉴于自然条件下慢性铝中毒多为食用或饮用含铝过高的食品或水源，因此本研究采用每天给予一定量铝盐，造成慢性铝吸收中毒模型，以研究其对脑内神经组织功能、生化指标和特殊部位病理形态学的影响。我们用 $AlCl_3$ 溶液持续 3 月给小鼠灌胃。研究结果显示，铝负荷呈时间依赖性缩短避暗潜伏期，而增加避暗错误次数；提示铝负荷小鼠的被动回避学习记忆能力进行性减弱。程控水迷宫实验中，铝负荷小鼠寻台时间呈时间依赖性明显延长，提示小鼠的空间识别能力进行性降低。病理切片显示铝负荷小鼠海马区神经元核固缩变性和细胞丢失呈时间依赖性进行性加重。上述结果提示，我们的经胃肠吸收的铝负荷致神经元退行性变模型建立成功。生化检测显示，皮层和海马总 SOD、SOD2 活性均在铝负荷 1 月后出现时间依赖性升高，2 月达最大坪值，3 月开始出现明显下降。类似结果也见于其他作者报道[11-12]。MDA 检测显示，铝负荷小鼠皮层和海马 MDA 水平与 SOD 基本呈平行变化；从 1 月开始升高，2 月达最大坪值，并一直保持到 3 月后。上述试验结果提示，在铝过负荷致神经元退行性改变过程中脑内氧化应激损伤与抗氧化应激保护从抗衡到失衡的过程。其中，MDA 的持续增高反映氧化应激损伤的加重，SOD 和 SOD2 活性的增高是机体本身的一种保护性措施，目的在于清除自由基。问题在于为什么抗氧化应激系统增强仍不能阻遏铝负荷所致氧化应激反应，并最终出现神经元退行性变？为此，我们测定了皮层和海马的总蛋白量。发现虽然皮层和海马 SOD 及 SOD2 活性在铝负荷 3 月有相当程度下降，但总蛋白量无下降，甚至有升高的趋势，而此时 MDA 水平基本与 2 月持平。这一奇怪现象提示，是否存在表达的 SOD 和 SOD2 的活性质量下降，而表达量并未降低？

SOD 是脑内清除自由基的主要酶类。目前发现的 SOD 酶主要包括 Cu-ZnSOD（SOD1）、Mn-SOD（SOD2）、EC-SOD3 种。其中 Cu-ZnSOD 主要存在于真核细胞胞浆中，Mn-SOD 主要存在于真核细胞线粒体和原核细胞中，EC-SOD 主要主要分泌到细胞外。在人体内发挥抗氧化应激作用的 SOD 主要是前两种[13]。大量实验证明线粒体功能障碍是神经系

维普资讯 http://www.cqvip.com

统退行性改变的共同致病原因。线粒体是主要的能量器官，同时，机体内 90%的自由基也由它产生。这些自由基中的 80%在线粒体内由 SOD2 转化解毒，剩余部分进入细胞浆由 SOD 或胞浆中其它酶清除。线粒体的结构特征决定其所存在的 DNA 极易受到自由基和超氧阴离子的攻击而发生突变，并最终诱发神经元退行性变[14]。因此，在本实验中 SOD、SOD2 活性在第 3 月下降，而总蛋白量反有增高趋势可能提示，铝负荷致氧化应激增强，自由基生成增加可能导致线立体 DNA 产生突变，表达功能下降的或无功能的 SOD 和 / 或 SOD2，是其诱导神经元退行性变的原因之一。有报道在转基因小鼠 SOD 基因突变可形成脊髓侧索性硬化神经元退变模型，而采用 RNAi 干涉技术可阻遏退变[15]。这一事实映证了我们的假设。有关的研究尚在进行中。

（通讯作者：周歧新，教授，博士生导师）

参 考 文 献

[1] Paolo Zatta, Roberto Lucchini, Susan J. van Rensburg, et al. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc [J]. Brain Research Bulletin, 2003;62:15-28.

[2] Kathleen J.S. Griffioen, Othman Ghribi, Nena Fox, et al. Aluminum Maltolate-Induced Toxicity in NT2 Cells Occurs Through Apoptosis an42-kDa Protein Includes Cytochrome c Release[J]. NeuroToxicology, 2004;25:859-867.

[3] 葛圣蕾.自由基氧化应激损伤在老龄化神经变性疾病中的作用[J].国外医学，老年医学分册，2002;23 (6):271-276.

[4] 刘燕池，蒋云娜，张沁园. 益智防呆汤防治口服三氯化铝所致痴呆小鼠作用机制的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2000;6 (4):15-20.

[5] 陈世铭，薛政国. 福定碱对大鼠学习和记忆的作用[J]. 药学学报，1987;22(1):801-806.

[6] 俞在芳，胡本荣，程冠军. GABA 受体拮抗剂对小鼠学习记忆的促进作用[J]. 药学学报，2000;6 (4): 15-20.

[7] 唐焕文，韦小敏，庄志雄，等. 铝致大鼠中枢神经系统病理形态学改变的研究[J].中国公共卫生，2002;18(8): 902-904.

[8] Campbell A, Becaria A, Lahiri DK, et al. Chronic exposure to aluminum in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain[J]. J Neurosci Res, 2004;75(4):565-572.

[9] 陈灶火，王 力.老年痴呆、帕金森病和脑梗死患者的记忆损伤特征[J]. 中国行为医学科学，2005;14 (7): 60 - 62.

[10] 何百成，杨俊卿，周歧新. 黄连总碱对铝负荷导致小鼠学习和记忆障碍保护作用的研究[J]. 中国药理通讯，2003;20 (3):37-37.

[11] Hugo Peluffo, Laia Acarin, Maryam Faiz, et al. Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury[J]. J Neuroinflammation, 2005;2(1):12.

[12] Omar Rawhi A., Chyan Y.-J., Andorn Anne C.,et al. Increased Expression but Reduced Activity of Antioxidant Enzymes in Alzheimer's Disease[J].Journal of Alzheimer's Disease, 1999;1(3):139-145.

[13] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ.Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression[J]. Free Radic Biol Med, 2002;33(3):337-349.

[14] Leonard J V, Schapira A H V. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects [J]. The Lancet, 2000;355(9201):389-394.

[15] Raoul C, Terki TA, Bensadou JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS[J]. Nat Med, 2005;11 (4):423-428.

（上接第 517 页）

metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells:preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial [J].Cancer Immunol Immunother,2002;51:637-644.

[12] 沈关心，周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉：湖北科学技术出版社，1998.302-303.

[13] Bachleitner-Hofmann T, Stift A, Friedl J, et al.Stimulation of Autologous Antitumor T-Cell Responses Against Medullary Thyroid Carcinoma Using Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells[J].The Journal of clinical endocrinology and metabolism,2002;87(3):1098-1104.

[14] 贾 英，孔凡兵，唐良苔，等.负载宫颈癌肿瘤裂解物的树突状细胞诱导的 CTL 杀伤效应[J].实用妇产科杂志，2005;21(7):416-419.

[15] 朱学军，曹雪涛，于益芝，等.人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J].中国肿瘤生物治疗杂志，1997;4(4):302-306.

[16] Syme R, Gluck S. Generation of dendritic cells:role of cytokines and potential clinical applications[J].official journal of the European Society for Haemapheresis,2001;24:117-124.

[17] O' Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al.Human blood contains two subsets of dendritic cells,one immunologically mature and the other immature[J]. Immunology,1994;82:487-493.

[18] Pan CC, Chen PC, Tsay SH,et al. Differential immunoprofiles of hepatocellular carcinoma,renal cell carcinoma,and adrenocortical carcinoma:a systemic immunohistochemical survey using tissue array technique [J].Applied immunohistochemistry and molecular morphology,2005;13:347-352.

[19] Panther E, Corinti S, Idzko M,et al.Adenosine affects expression of membrane molecules,cytokine and chemokine release,and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells [J].Blood,2003;101:3985-3990.