

慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究

莫颂轶, 张丽凤, 黄彦峰, 余双全, 廖素婵, 黄永毅, 梁祚仁, 黎 昀,
蒋敏丽, 黄俊杰*

(右江民族医学院应用生理研究室, 广西 百色 533000)

【摘要】 目的 通过观察慢性铝中毒小鼠学习记忆能力的变化以及大脑皮层乙酰胆碱(ACh)、 β -内啡肽(β -EP)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的变化,探讨铝中毒导致小鼠认知能力障碍的机制。**方法** 用 AlCl_3 水溶液拌入饲料中喂养小鼠,建立不同程度铝中毒模型小鼠。染毒三个月后,Y型迷宫实验测试小鼠学习记忆能力,测定大脑皮层ACh、 β -EP、SOD和MDA含量。**结果** 与对照组相比,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠学习测试次数和记忆错误次数均明显增多,大脑皮层ACh、 β -EP和SOD含量均明显降低,而大脑皮层MDA含量却升高。中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层中ACh、 β -EP和SOD均与相应同剂量组学习测试次数和记忆错误次数均呈负相关;高剂量铝中毒组MDA含量与同剂量组学习测试次数和记忆错误次数均呈正相关。**结论** 铝可能通过降低大脑皮层中ACh、 β -EP和SOD含量,提高MDA含量,进而影响小鼠学习与记忆能力,这可能是铝中毒致小鼠认知能力障碍的机制之一。

【关键词】 铝中毒;学习记忆;乙酰胆碱; β -内啡肽;超氧化物歧化酶;丙二醛;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0063-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 07. 011

Relationships between learning and memory abilities and levels of ACh, β -EP, SOD, and MDA in the cerebral cortex of mice with chronic aluminum toxicities

MO Songyi, ZHANG Lifeng, HUANG Yanfeng, YU Shuangquan, LIAO Suchan,
HUANG Yongyi, LIANG Zuoren, LI Yun, JIANG Minli, HUANG Junjie*

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms underlying cognitive impairment induced by chronic aluminum exposure through observing the relationships between learning and memory functions and levels of ACh, β -EP, SOD, and MDA in the mouse cerebral cortex. **Methods** Mice were fed diets containing various doses of AlCl_3 . Their learning and memory abilities were measured by the Y maze test, and levels of ACh, β -EP, SOD, and MDA in the mouse cerebral cortex were measured at end of the experiment. **Results** The learning times and memory errors in groups administered moderate and high doses of aluminum were significantly increased compared with those in the control group. The levels of ACh, β -EP, and SOD in the cerebral cortex were decreased significantly, whereas the MDA level in the cerebral cortex was increased in groups administered moderate and high doses of aluminum compared with the control

[基金项目] 广西壮族自治区教育厅高校科研重点项目(编号:ZD2014101)。

[作者简介] 莫颂轶(1978—),女,医学硕士,讲师,主要从事病原生物学及职业病防治研究。E-mail: 110056608@qq.com

[通信作者] 黄俊杰(1970—),男,医学硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经生理与神经系统疾病。E-mail: 1559199466@qq.com

group. ACh, β -EP and SOD levels in the cerebral cortex were negatively correlated with learning times and memory errors in mice administered moderate and high doses of aluminum. MDA levels were positively correlated with learning times and memory errors in mice administered the high dose of aluminum. **Conclusions** Aluminum reduces the abilities of learning and memory in mice, possibly through decreasing the levels of ACh, β -EP, and SOD, and increasing the MDA level in the cerebral cortex, which may be the mechanisms underlying aluminum-induced cognitive impairment in mice.

[Key words] aluminum toxicities; learning and memory; acetylcholine; β -endorphin; superoxide dismutase; malondialdehyde; mice

由于铝在各领域的广泛应用,人类在日常生活中接触铝制品的日益增多,铝可被摄取、吸收并在全身组织器官中分布^[1-2]。铝是一种慢性神经毒性物质,脑是铝的蓄积部位和主要靶器官,铝可通过血脑屏障进入脑组织产生神经行为毒性作用,神经细胞对于铝的毒性十分敏感,长期铝暴露可导致人的认知能力和智力下降^[3-4]。铝暴露所导致的神经系统损害已成为全球性公共卫生问题,然而慢性铝中毒如何影响学习和记忆的机制尚未完全阐明,造成了慢性铝中毒防治的困难。为此,本实验通过建立慢性铝中毒小鼠动物模型,测试小鼠的学习和记忆能力,以及测定大脑皮层乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量、 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,研究慢性铝中毒小鼠学习记忆的影响与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 和 MDA 的关系,探讨铝中毒小鼠导致认知能力障碍的机制,为慢性铝中毒的预防提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 KM 小鼠 32 只,雌雄各半,3 月龄,小鼠体重 20 ~ 22 g,由右江民族医学院提供[SCXK(桂)2017-0003]。小鼠饲养于右江民族医学院实验动物中心[SYXK(桂)2017-0004],饲养环境:室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40% ~ 60%,自由进水。小鼠的组织取材于右江民族医学院应用生理研究室进行。

1.2 主要试剂与仪器

三氯化铝(AlCl_3)(天津市大茂化学试剂厂);小鼠 β -内啡肽试剂盒购于 Sigma 公司;SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、ACh 试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。UV-1700 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FSH-2 可调高速匀浆机(江苏省金坛市宏华

仪器厂),Y 型迷宫刺激器(MG-B,张家港市教学实验器械厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和铝中毒模型建立^[5-6]

32 只 KM 小鼠,随机分为四组,分别是正常对照组、低剂量铝中毒组、中剂量铝中毒组、高剂量铝中毒组,每组均为 8 只小鼠,各组小鼠雌雄各半,雌雄分笼饲养。正常对照组普通饲料饲养三个月;各剂量铝中毒组均用 16 g/L 浓度的 AlCl_3 水溶液拌入饲料中喂养小鼠,低剂量铝中毒组每天按 1.2 mg/kg 体重剂量、中剂量铝中毒组每天按 12 mg/kg 体重剂量、高剂量铝中毒组每天按 120 mg/kg 体重剂量喂养小鼠,每天先喂完拌有 AlCl_3 的饲料后再喂普通饲料,保证各组铝的摄入量,各剂量铝中毒组连续摄入铝三个月。本研究所涉及的动物实验均经过右江民族医学院伦理委员会批准,并严格执行实验动物安全制度及相关规章。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.2 小鼠学习记忆能力测试

各组小鼠的学习和记忆行为能力用 Y 型迷宫刺激器进行检测。按文献^[7-8]的实验方法和学会标准,将小鼠达到学会标准时所需的测试次数,作为大鼠学习行为能力的检测指标。学习能力检测 24 h 后,依照上述方法对小鼠连续进行 20 次测试,记录小鼠在 20 次测试中的错误次数,作为小鼠记忆行为能力的检测指标。

1.3.3 小鼠大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 和 MDA 含量测定

各组小鼠在三个月后断头处死取出脑组织,快速剥离出大脑皮层,用生理盐水制作成 10% 的匀浆,取匀浆的上清液分别测定大脑皮层中 ACh 含量、 β -EP 含量、SOD 活性和 MDA 含量,各指标的测试步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 进行统计分析,实验数据以平均

数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性;学习记忆能力与各指标间的关系采用 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为相关性显著。

2 结果

2.1 慢性铝中毒小鼠学习和记忆测试结果

单因素方差分析显示,各组间小鼠学习测试次数和记忆错误次数差异均有显著性(分别为 $F = 18.96, P < 0.01; F = 25.99, P < 0.01$)。中剂量、高剂量铝中毒组小鼠学习测试次数比对照组均明显增多,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠学习测试次数比低剂量组也明显增多;低剂量、中剂量、高剂量铝中毒组小鼠记忆错误次数比对照组均明显增多,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠记忆错误次数比低剂量组也明显增多;差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 1。

表 1 慢性铝中毒小鼠学习和记忆测试结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	学习测试次数 Learning test times	记忆错误次数 Memory error times
对照组 Control group	15.13 ± 1.64	4.25 ± 1.04
低剂量组 Low-dose group	17.00 ± 1.31	5.88 ± 1.36 *
中剂量组 Moderate-dose group	20.13 ± 2.30 **▲▲	7.88 ± 1.46 **▲
高剂量组 High-dose group	22.25 ± 2.71 **▲▲	10.88 ± 2.23 **▲▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the low-dose group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$.

2.2 慢性铝中毒小鼠大脑皮层中 ACh 和 β-EP 含量

单因素方差分析显示,各组间小鼠大脑皮层 ACh 和 β-EP 含量差异均有显著性(分别为 $F = 10.05, P < 0.01; F = 6.53, P < 0.01$)。中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 ACh 含量比对照组明显降低,高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 ACh 含量比低剂量组也明显降低;低、中、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 β-EP 含量比对照组明显降低,高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 β-EP 含量比低剂量组明显降低;差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 慢性铝中毒小鼠大脑皮层中 ACh 和 β-EP 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 ACh and β-EP levels in the cerebral cortex of mice with chronic aluminum toxicities

组别 Groups	ACh(μg/mgprot)	β-EP(pg/mL)
对照组 Control group	9.92 ± 2.28	45.16 ± 6.47
低剂量组 Low-dose group	8.24 ± 1.72	39.58 ± 2.65 *
中剂量组 Moderate-dose group	7.58 ± 2.15 *	36.17 ± 7.81 **
高剂量组 High-dose group	4.79 ± 1.31 **▲▲	33.98 ± 2.50 **▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the low-dose group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$.

2.3 慢性铝中毒小鼠大脑皮层中 SOD 活性和 MDA 含量的测定结果

单因素方差分析显示,各组间大脑皮层 SOD 活性和 MDA 含量差异均有显著性(分别为 $F = 10.60, P < 0.01; F = 7.16, P = 0.01$)。与对照组相比较,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 SOD 活性均明显降低,而中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 MDA 含量均升高,差异均有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与低剂量组相比较,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 SOD 活性均降低,而高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层 MDA 含量升高,差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 慢性铝中毒小鼠大脑皮层中 SOD 活性和 MDA 含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 SOD and MDA levels in the cerebral cortex of mice with chronic aluminum toxicities

组别 Groups	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
对照组 Control group	90.16 ± 11.41	14.06 ± 1.86
低剂量组 Low-dose group	82.99 ± 7.74	15.93 ± 3.53
中剂量组 Moderate-dose group	72.97 ± 9.02 **▲	18.05 ± 3.31 *
高剂量组 High-dose group	66.15 ± 8.31 **▲▲	20.45 ± 2.65 **▲▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the low-dose group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$.

2.4 慢性铝中毒小鼠学习和记忆与大脑皮层神经递质及自由基的相关性分析

Pearson 相关性分析显示,中剂量、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层中 ACh、β-EP 和 SOD 均与相应

同剂量组学习测试次数和记忆错误次数均呈负相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层中 MDA 含量与同剂量组学习测试次数和记忆错误次数均呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 4。

3 讨论

学习与记忆是两个有联系的神经活动过程,是动物和人类中枢神经系统的高级功能活动。迄今为止,有关学习和记忆的机制仍不十分清楚。已有研究表明,学习和记忆力与神经系统中的神经递质乙酰胆碱密切相关^[9-12],脑内乙酰胆碱有促进学习和记忆的作用;阿片肽是神经肽的主要成员,内啡肽属于阿片肽中的一族,内啡肽中主要是 β -内啡肽,有研究报道, β -内啡肽可易化记忆^[13-14],其作用与给药剂量和给药时间呈明显相关性,但也有人认为 β -内啡肽可损害记忆能力^[15]。

本研究结果发现,各剂量铝中毒组小鼠学习训练次数和记忆错误次数均高于正常对照组,且学习训练次数和记忆错误次数增多的幅度随着铝中毒剂量的增高而增多,这说明慢性铝中毒可致小鼠学习和记忆能力下降,这与文献报道^[4, 16]一致。本研究结果还显示,各剂量铝中毒组小鼠学习测试次数和记忆错误次数增加的同时,其大脑皮层乙酰胆碱和 β -内啡肽的含量反而明显低于对照组,且小鼠学习记忆能力明显下降,大脑皮层乙酰胆碱和 β -内啡

肽也随之明显降低,呈现了一定的剂量效应关系;通过 Pearson 相关性分析显示,中、高剂量铝中毒组小鼠大脑皮层中乙酰胆碱和 β -内啡肽均与相应同剂量组学习测试次数、记忆错误次数均呈负相关,这说明大脑皮层中乙酰胆碱和 β -内啡肽参与学习和记忆的神经递质,大脑皮层中乙酰胆碱和 β -内啡肽均有促进学习和记忆的作用,与文献报道^[12-13]一致。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的酶,在保护细胞免受氧自由基的毒害中发挥着重要作用;自由基攻击膜脂中的不饱和脂肪酸,使其发生氧化,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)就会升高。本研究结果表明,中、高剂量铝中毒组大脑皮层 SOD 活性均明显降低,而中、高剂量铝中毒组大脑皮层 MDA 含量均升高;高剂量组小鼠大脑皮层中 SOD 与学习测试次数和记忆错误次数均呈负相关;而 MDA 含量与学习测试次数和记忆错误次数呈正相关。慢性铝中毒使铝在体内脑、骨、肝等多个组织中蓄积,特别铝可以通过血脑屏障进入脑组织产生神经行为毒性作用^[17-18]。进入脑组织内的铝可引起大脑皮层脂质过氧化增强和产生自由基增多^[19-20],氧自由基引起的 DNA 损伤可激活 p53 基因,氧自由基的氧化应激可活化核转录因子 NF- κ B 和 Caspase 基因家族等途径,可加速细胞凋亡相关基因的表达,引起神经细胞凋亡。因此,铝中毒后

表 4 慢性铝中毒小鼠学习和记忆与大脑皮层神经递质及自由基的相关性分析($n=8$)
Table 4 Correlation analysis between learning and memory abilities and the levels of ACh, β -EP, SOD, and MDA in the cerebral cortex of mice with chronic aluminum toxicities

脑组织中指标 Indices in the cerebral cortex	学习测试次数 Learning test times		记忆错误次数 Memory error times	
	r 值	P 值	r 值	P 值
	Value of correlation coefficient	P-value	Value of correlation coefficient	P-value
中剂量组 ACh ACh in the Moderate-dose group	-0.876	0.004	-0.788	0.020
高剂量组 ACh ACh in the high-dose group	-0.851	0.007	-0.709	0.049
中剂量组 β -EP β -EP in the Moderate-dose group	-0.889	0.003	-0.799	0.017
高剂量组 β -EP β -EP in the high-dose group	-0.784	0.021	-0.795	0.018
中剂量组 SOD SOD in the Moderate-dose group	-0.729	0.040	-0.866	0.005
高剂量组 SOD SOD in the high-dose group	-0.796	0.018	-0.761	0.028
高剂量组 MDA MDA in the high-dose group	0.782	0.022	0.898	0.002

导致小鼠神经细胞凋亡增加,从而使小鼠学习记忆受到损伤^[21-22]。

综上所述,不同剂量铝中毒可引起小鼠认知功能障碍,铝中毒可能通过降低大脑皮层中乙酰胆碱、 β -内啡肽和 SOD 含量,升高 MDA 含量,进而影响小鼠学习与记忆能力,这可能是铝中毒致小鼠认知能力障碍的机制之一。但其具体的机制还有待于进一步研究和探讨。

参考文献:

- [1] 李瑞,任佩,崔双杰,等. 职业铝接触工人认知功能的改变及血浆中 CDK5 与磷酸化 tau 蛋白的关系 [J]. 环境与职业医学, 2016, 33(7): 633-637.
- [2] 张立丰,赵丽妮,白春玉,等. 亚慢性铝暴露对大鼠学习记忆及大脑皮质 c-fos mRNA 和 c-Fos 蛋白表达的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 447-451.
- [3] Zhang L, Jin C, Lu X, et al. Aluminium chloride impairs long-term memory and downregulates cAMP-PKA-CREB signalling in rats [J]. Toxicology, 2014, 323: 95-108.
- [4] Nampoothiri M, Kumar N, Venkata Ramalingayya G, et al. Effect of insulin on spatial memory in aluminum chloride-induced dementia in rats [J]. Neuroreport, 2017, 28(9): 540-544.
- [5] 李秋营,杨艳旭,张太强,等. 实验性大鼠铝中毒模型建立 [J]. 山西医药杂志, 2002, 31(2): 113-115.
- [6] 张立丰,白春玉,张迪,等. 亚慢性铝暴露对 Wistar 大鼠学习记忆及海马 CA1 区 c-Fos 表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(5): 553-557.
- [7] 荆治华,未小明,王少虎,等. 一氧化氮和烟碱型乙酰胆碱受体在大鼠学习记忆中的联合作用 [J]. 生理学报, 2014, 66(3): 307-314.
- [8] 孔林林,张军,乔枫,等. 基于小鼠 Morris 水迷宫和 Y 迷宫联合试验的多任务行为学测试研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(4): 365-368.
- [9] 杨晓华,赖江华. 乙酰胆碱的功能及其在酒精依赖中的作用机制 [J]. 生命的化学, 2015, 35(4): 531-536.
- [10] 郑前敏,徐平. 认知功能相关的动物行为学实验研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 85-89.
- [11] Lange-Asschenfeldt C, Schäble S, Suvorava T, et al. Effects of

- varenicline on $\alpha 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptor expression and cognitive performance in mice [J]. Neuropharmacology, 2016, 107: 100-110.
- [12] 黄维,马晶,晁洪蕾,等. 氟西汀通过增加阿尔茨海默病 APP/PSI 转基因小鼠脑内乙酰胆碱的含量改善其空间学习能力 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(1): 29-34.
- [13] 李小刚,汤洪川,黄克维. 血管性痴呆大鼠脑区和血浆中 β -EP 含量的变化 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1996, 12(4): 230-232.
- [14] 姜孝德,牛文民,李书晓. 嗅三针对血管性痴呆大鼠学习记忆功能及血浆 β -内啡肽含量的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34(1): 70-71.
- [15] 陈丽萍,马光瑜. 纳洛酮对慢性酒精中毒学习记忆障碍大鼠脑内阿片肽含量的影响 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2008, 14(2): 84-87.
- [16] Wang B, Zhao J, Yu M, et al. Disturbance of intracellular calcium homeostasis and CaMKII/CREB signaling is associated with learning and memory impairments induced by chronic aluminum exposure [J]. Neurotox Res, 2014, 26(1): 52-63.
- [17] 周泽文,庞雅琴,漆光紫,等. 职业性铝接触对作业工人心理、神经行为、认知及自主神经功能的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(2): 242-247.
- [18] Molloy DW, Standish TI, Nieboer E, et al. Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans [J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 70(23): 2011-2019.
- [19] 冯彤,刘萍,张震,等. 1, 2-二甲基-3-羟基-4-吡啶酮和牛磺酸联合干预对铝染毒大鼠大脑皮层抗氧化系统的保护作用 [J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(11): 973-976.
- [20] 周玉,王伶俐,黄杨,等. 糖尿病大鼠的 SOD 活性与抗氧化剂治疗对机体抗氧化状态的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(4): 422-426.
- [21] 牛侨,张勤丽,牛丕业,等. 铝对体外培养大鼠神经细胞凋亡的研究 [J]. 卫生研究, 2007, 36(4): 407-413.
- [22] 殷金珠,牛侨. 铝和苯并[a]芘联合染毒对神经细胞凋亡的影响 [J]. 毒理学杂志, 2014, 28(2): 134-138.

[收稿日期]2018-02-12