

三氯化铝对大鼠学习记忆的影响

唐焕文¹, 韦小敏¹, 谢佩意¹, 黄彦妮², 王清海³

(1. 广西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 广西柳州市第一人民医院, 广西 柳州 545001; 3. 广西平果铝业公司职工医院, 广西 平果 531400)

摘要: 目的 研究三氯化铝对学习记忆及脑神经细胞数和海马颗粒空泡变性(GVD)的影响。方法 将144只大鼠分为腹腔注射AlCl₃剂量组和生理盐水对照组,于染铝4、8、12周时分别进行跳台实验,第二天处死动物,取各脑区标本进行光镜观察。结果 大鼠跳台实验表明,与对照组比较,各时间剂量组大鼠主动回避次数显著下降,被动逃避延迟时间显著延长($P < 0.01$)。15.0 mg/kg 4周及5.0 mg/kg 12周组就有大脑顶叶锥体层锥体细胞、海马锥体细胞和小脑浦肯野细胞数显著减少($P < 0.01$)。5.0 mg/kg 8周组、15.0 mg/kg 及25.0 mg/kg 4周组的GVD细胞数显著增加($P < 0.01$),且各剂量组细胞GVD阳性率与铝剂量有显著相关性。结论 证实了铝对大鼠学习记忆的影响,提示该毒性与铝导致神经细胞数减少和海马GVD细胞增加有关。

关键词: 三氯化铝; 学习记忆; 颗粒空泡变性

中图分类号: O614.31 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)03-0141-03

Effects of aluminum trichloride on learning memory in rats

TANG Huan-wen¹, WEI Xiao-min¹, XIE Pei-yi¹, HUANG Yan-ni², WANG Qing-hai³

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Liuzhou First People's Hospital, Guangxi 545001; 3. Workers' Hospital of Pingguo Aluminum Corporation, Guangxi 531400, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of aluminum trichloride on learning memory and the numbers of cerebral neuron and granulovacuolar degeneration (GVD) in the hippocampus of rats. **Methods** One hundred and forty-four rats were divided into four groups intraperitoneally injected with 5.0, 15.0 and 25.0 mg/(kg·d) of aluminum trichloride and normal saline, respectively. Step-down test was performed for the rats four, eight and twelve weeks after exposure, the animals were killed on the next day of the test and their brain tissues were excised for light microscopy. **Results** Step-down test showed that the number of active avoidance response decreased and the time for passive avoidance response prolonged significantly ($P < 0.01$) in the exposed rats as compared to the controls. The number of cerebral pyramidal neuron, hippocampal pyramidal cells and cerebellar Purkinje's cells decreased significantly in the rats exposed to 15.0 mg/kg of aluminum trichloride for four weeks and 5.0 mg/kg of aluminum trichloride for 12 weeks. Number of positive GVD cells correlated with the dose of exposure to aluminum trichloride. **Conclusion** Aluminum can affect learning memory in rats which may be associated with the decrease of the number of neuron and the increase of GVD cells in the hippocampus.

Key words: Aluminum trichloride; Learning memory; Granulovacuolar degeneration

铝是一种慢性神经毒性物质,与 Alzheimer's (AD) 的关系密切,可使神经系统发生退行性改变^[1]。动物实验和流行病学调查均证实了铝可引起学习记忆及认知能力障碍,大多数神经系统退行性疾病的病理改变有神经细胞数目的减少。铝是否可以导致不同脑区神经细胞数目减少,从而表现出神经毒性,目前这方面研究较少。本文旨在通过大鼠实验,观察在染铝一定时间后大鼠的学习记忆表现和神经细胞数目变化,以探讨其神经毒作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康 Wistar 成年大鼠 144 只,雌雄各半,体质量 200~250 g,由广西医科大学实验动物中心提供,适应性饲养 1 周后,按体质量随机分为 4 组,每组 36 只,设 3 个剂量组,分别腹腔注射三氯化铝溶液 5.0、15.0、25.0 mg/(kg·d) 和生理盐水对照组。动物自由摄食、饮水,连续注射 3 天,间隔 1 天。

1.2 大鼠跳台实验

于染铝 4、8、12 周时,采用跳台法测定大鼠近期学习记忆能力。实验分为训练和正式测试两部分,挑选对电击反应较一致的大鼠进行正式实验,训练期为 1 天共 20 次,第 2 天进行正式测试,每只大鼠观察 10 次反应,将大鼠放入箱中适应环境 1 分钟,以

收稿日期: 2001-10-25; 修回日期: 2001-12-20

基金项目: 广西壮族自治区科学技术基金 (2001-18 号)

作者简介: 唐焕文 (1968-), 男, 劳动卫生与职业病专业硕士, 现在中山大学公共卫生学院攻读卫生毒理学专业博士学位。

铃声为条件刺激, 铃响后 5 秒钟, 给予 40 V 电压为非条件刺激, 使大鼠跳上跳台, 铃响 5 秒内大鼠主动跳上跳台为主动回避反应, 并记录其次数, 5 秒内不主动逃避则为被动反应, 记录从通电到跳上跳台的时间(被动逃避延迟时间), 连续观察 3 分钟, 若停留在铜栅上超过 3 分钟其延迟时间以 180 秒计。

1.3 脑神经元细胞计数和海马神经细胞 GVD 的观察

跳台实验后第 2 天, 每组随机抽取 6 只大鼠断头处死, 并迅速在冰台上开颅取脑, 分离大脑、小脑、海马 3 个脑区, 切取右侧脑组织用 10% 甲醛磷酸缓冲液保存。用 AO 切片机进行常规切片, 同一区域的组织块三维定位相同, 每只大鼠取相同间隔 3 个切面, 进行常规 HE 染色。各切片观察 3 个视野, 高倍镜 10×45 下计数大脑顶叶锥体层神经元细胞数和海

马锥体细胞数, 低倍镜 10×10 下计数小脑浦肯野细胞数。同时观察海马神经细胞是否发生 GVD, 并计数 1 张片 300 个神经细胞中发生 GVD 的细胞数。

1.4 统计分析

所得数据均用(均数±标准差)表示, 采用 F 检验及相关分析进行统计处理。

2 结果

2.1 铝对大鼠学习记忆功能的影响

与对照组比较, 5.0 mg/kg 4 周组的被动逃避延迟时间延长, 4 周和 8 周组主动反应次数减少, 差异均有显著性 ($P < 0.05$), 其余剂量时间组的被动逃避延迟时间均显著增加, 主动回避次数极显著减少 ($P < 0.01$), 随染毒剂量和时间的增加被动逃避延迟时间延长, 主动回避次数减少。见表 1。

表 1 三氯化铝对大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	测定次数	4 周		8 周		12 周	
		被动逃避延迟时间	主动反应次数	被动逃避延迟时间	主动反应次数	被动逃避延迟时间	主动反应次数
对照组	8×10	7.16±0.82	2.75±1.28	7.21±1.10	2.63±1.19	9.79±3.84	2.13±0.84
5 mg/kg	8×10	8.16±0.80 [△]	1.63±1.06 [△]	13.82±1.47 [▲]	1.38±1.06 [△]	29.53±7.57 [▲]	0.75±0.32 [▲]
15 mg/kg	7×10	11.23±1.36 [▲]	1.43±0.97 [▲]	23.44±1.97 [▲]	1.00±0.54 [▲]	62.26±9.07 [▲]	0.62±0.51 [▲]
25 mg/kg	7×10	26.96±1.81	1.05±0.52 [▲]	52.21±2.88 [▲]	0.84±0.45 [▲]	98.36±9.66 [▲]	0.37±0.29 [▲]

注: 观察视野为 6×3×3; 与对照组相比 [△] $P < 0.05$ [▲] $P < 0.01$

2.2 铝对大鼠大脑、小脑、海马神经细胞数目的影响

与对照组相比, 5.0 mg/kg 4 周组三种脑神经细胞及 8 周组小脑浦肯野细胞和海马锥体细胞差异均无显

著性 ($P > 0.05$), 15.0 mg/g 4 周组小脑浦肯野及海马锥体细胞数显著减少 ($P < 0.05$), 其余剂量时间组各脑区神经细胞数均极显著少于对照组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 不同浓度三氯化铝在不同染毒时间对脑神经细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

染毒时间	细胞类别	组别			
		对照	5 mg/kg	15 mg/kg	25 mg/kg
4 周	大脑锥体细胞	55.61±5.73	54.96±4.29	42.06±4.02 [▲]	31.56±4.53 [▲]
	小脑浦肯野细胞	79.33±5.78	77.56±6.21	63.67±5.69 [△]	44.17±3.33 [▲]
	海马锥体细胞	106.89±4.78	105.28±3.89	97.72±3.83 [△]	91.00±3.07 [▲]
8 周	大脑锥体细胞	54.83±7.33	43.17±6.02 [▲]	36.61±6.25 [▲]	25.67±4.28 [▲]
	小脑浦肯野细胞	73.78±7.53	72.22±7.46	57.67±6.85 [▲]	30.56±5.16 [▲]
	海马锥体细胞	104.06±4.91	103.39±3.62	97.50±4.18 [▲]	91.50±3.19 [▲]
12 周	大脑锥体细胞	52.44±5.83	36.06±4.94 [▲]	26.39±4.38 [▲]	21.28±3.56 [▲]
	小脑浦肯野细胞	71.44±5.50	50.67±3.43 [▲]	30.83±4.03 [▲]	22.72±3.14 [▲]
	海马锥体细胞	100.17±4.93	90.14±3.79 [▲]	81.06±4.65 [▲]	60.50±4.93 [▲]

与对照组相比 [△] $P < 0.05$ [▲] $P < 0.01$

2.3 对海马神经细胞 GVD 的影响

各组海马神经细胞均有 GVD, 变性细胞胞质染色较淡, 呈明显网状或空泡样; 与对照组比较, 5.0 mg/kg 4 周组的 GVD 数差异无显著性 ($P > 0.05$),

15.0 mg/kg 4 周组 GVD 数显著增多且差异有显著性 ($P < 0.05$), 其余各剂量时间组差异均有极显著性 ($P < 0.01$)。经相关分析, 染铝剂量与 GVD 细胞阳性率有显著相关性 (r 分别为 0.9147, 0.9780,

0.943 2, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 不同染铝时间剂量组大鼠海马切片 GVD 细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	观察切片数	4周		8周		12周	
		GVD 数 (个)	阳性率 (%)	GVD 数 (个)	阳性率 (%)	GVD 数 (个)	阳性率 (%)
对照	6×3	2.1±1.6	0.70	2.3±1.2	0.77	3.4±1.7	1.13
5 mg/kg	6×3	2.2±1.8	0.73	14.8±1.7 [▲]	4.93	19.5±2.7 [▲]	6.50
15 mg/kg	6×3	7.3±2.2 [△]	2.43	21.2±1.8 [▲]	7.07	31.6±2.6 [▲]	10.53
25 mg/kg	6×3	18.3±2.7 [▲]	6.10	32.9±2.0 [▲]	10.97	45.1±1.7 [▲]	15.03

与对照组相比, $\triangle P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

本研究采用腹腔注射 $AlCl_3$ 为染毒途径, 既克服了经胃肠道染毒时间长、吸收率低及个体差异大的缺点^[2], 又避免了脑室内注射技术要求高、操作复杂、动物意外死亡率高的不足^[3]。铝对学习记忆的抑制作用已在多数动物和人身上得到证实。White 等^[4]调查了在铝冶炼厂直接与铝粉尘接触 12~23 年的 25 名工人, 其中 21 人出现明显的记忆减退。小鼠腹腔注射 $AlCl_3$ 1 个月后, 其条件回避反应率明显低于对照组^[5], Connor 等^[6]报道硫酸铝可导致大鼠被动回避反应能力明显下降。本实验结果表明, 染铝 4 周就可使主动反应次数显著减少, 被动逃避延迟时间显著增加, 说明三氯化铝可损害大鼠的学习记忆功能。这可能是由于铝在各脑区核团中的蓄积, 以及继发对胆碱能神经元的毒性作用; 或引起中枢神经递质含量减少; 或与己糖激酶等竞争性结合, 干扰脑内葡萄糖代谢, 使脑内代谢紊乱; 从而导致学习记忆能力下降。

郑观成等^[7]报道, 有认知学习记忆障碍的老年性痴呆患者大脑皮质神经元数目明显减少。海马神经元数目减少可达 44.3%~57.0%。本实验结果表明铝可引起大脑顶叶、小脑及海马神经元细胞数目减少, 而神经元数目与学习记忆密切相关, 说明铝引起的神经元细胞数减少也是导致动物学习记忆障碍的机理之一。

在 Alzheimer 病 (AD) 的特征性病理学改变中, GVD 被认为是更具“专一性”的组织学标志, 海马神经细胞 GVD 细胞阳性率为 9% 时即对 Alzheimer 病有诊断意义^[8]。本实验结果显示, 海马神经细胞 GVD 阳性率与染铝剂量呈显著相关性, 表明铝可促使海马神经细胞发生 GVD; 同时随着染毒剂量的增加和时间的延长, 大鼠学习记忆受损程度、各脑区神经细胞减少

程度以及海马 GVD 细胞阳性率均有逐渐增加的趋势; 表明这 5 者之间有一定的内在联系, 提示 GVD 细胞阳性率与痴呆程度可能具有一定的相关性。这也可能是大鼠在跳台实验中忘记跳台位置, 导致主动回避次数减少, 且随染铝剂量和时间的增加而减少, 和被动逃避延迟时间变长的原因。但 AD 的病因十分复杂^[9], 且有报道认为, 铝是神经元纤维缠结 (NFT) 形成的辅助因素^[10]。所以仅就本次实验研究结果, 还不能对铝与 AD 的关系作出肯定的结论, 有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Crapper DR, Kruck TPA, Vanberkum MFA. Aluminum and neurodegenerative disease; therapeutic implication [J]. Am J Kidney Dis, 1985, 6 (5): 322-329.
- [2] 朱清华, 熊希凯, 章锡平, 等. 铝对大鼠学习记忆神经递质结构形态的损害 [J]. 同济医科大学学报, 1992, 21 (增): 8-10.
- [3] 李玲, 陈筑. 脑室注射氯化铝对小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 贵阳医学院学报, 1998, 23 (3): 272-273.
- [4] White DM, Longstreth WT Jr, Rosenstock L, et al. Neurologic syndrome in 25 workers from an aluminum smelting plant [J]. Arch Intern Med, 1992, 152: 1443-1448.
- [5] Yen-koo HC. The effect of aluminum on conditioned avoidance (CAR) in mice [J]. Toxicol Ind Health, 1992, 8 (1-2): 1-7.
- [6] Connor DJ, Harrell LE, Jope KS. Reversal of an aluminum induced behavioral deficit by administration of deferoxamine [J]. Behav Neurosci, 1989, 103: 779.
- [7] 郑观成. 脑老化与老年性痴呆 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995. 55-69.
- [8] Ball MJ, IO P. Granulovascular degeneration in the aging brain and in dementia [J]. J Neuropath Exp Neurol, 1997, 36: 474-487.
- [9] Belojovic G, Jakovljevic B. Aluminum and Alzheimer's disease [J]. Srp Arh Celok Lek, 1998, 126 (7-8): 283-289.
- [10] Lqbal K, Alonso AC, Gong CX, et al. Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles [J]. J Neural Transm Suppl, 1998, 53: 169-180.