

亚慢性染铝对断乳大鼠神经行为学的影响

刘秋芳¹, 靳翠红¹, 唐秋实¹, 王军明¹, 曹哲瑶², 蔡原^{1*}

(1. 中国医科大学公共卫生学院毒理教研室, 辽宁 沈阳 110004; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044)

摘要: 目的 研究亚慢性染铝对断乳大鼠神经行为学和神经细胞形态学的影响, 以明确铝对发育中的中枢神经系统的毒性作用, 为机制研究提供理论依据和实验资料。方法 对刚断乳 Wistar 大鼠通过饮水亚慢性连续染毒 12 周, 采用原子吸收石墨炉法进行血铝和脑铝含量的测定; 跳台试验法观察大鼠学习、记忆行为学的改变; HE 染色和尼氏染色后, 光镜观察海马形态学改变。结果 高剂量染铝组脑组织系数显著低于对照组; 随着染铝剂量的增加, 染铝组血铝和脑铝浓度显著升高 ($P < 0.05$ $P < 0.01$), 低、高剂量组之间脑铝差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 大鼠跳台试验的潜伏期随铝暴露剂量增加逐渐缩短, 而错误次数逐渐增加, 有明显的剂量-效应关系 ($P < 0.01$)。海马 HE 和尼氏染色后光镜观察表明, 各染铝组与对照组相比均未发现明显差异。结论 亚慢性铝暴露可以引起发育中大鼠学习记忆能力下降, 但其形态学观察未见器质性病变。

关键词: 铝; 亚慢性; 学习记忆; 形态学

中图分类号: O614.34; R595 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)01-0010-03

Effect of subchronic exposure to aluminum on neural behavior in weaning rats

LIU Qiufang, JIN Cuihong, TANG Qiu-shi, WANG Junming, CAO Zhe-yao, CAI Yuan*

(1. Department of Toxicology School of Public Health China Medical University Shenyang 110004, China

2. Dalian Medical University Dalian 116044 China)

Abstract: Objective To explore the effects of subchronic exposure to aluminum on neural behavior and hippocampal morphology in weaning rats. Methods Weaning Wistar rats were randomly divided into three groups according to the body weight. Aluminum chloride was administered through drinking water with the concentrations of 0.2% and 0.4% (m/v) respectively for 12 weeks. The blood levels of aluminum were determined by atomic absorption spectrophotometry, the neural behavior was examined by step down test, and the hippocampal morphological changes were observed under light microscope with HE and Nissl's stainings. Results The brain coefficients of exposed rats was remarkably lower than that of the controls and dose-dependent. The levels of aluminum in both blood and brain was increased significantly along with the administered dosage ($P < 0.05$ $P < 0.01$). On the other hand, the latent period of step down test in exposed rats was shortened while the mistake frequency was increased significantly along with the increase of aluminum dosage ($P < 0.01$). But no obvious morphological changes in the hippocampus of exposed rats was found. Conclusions There were some adverse effects on learning and memory abilities by subchronic exposure to aluminum in the weaning rats, but no morphological change could be found in the study.

Key words: Aluminum; Subchronic exposure; Ability in learning and memory; Morphology

多种神经退行性疾病与铝的慢性蓄积有关, 如阿尔茨海默病 (AD)、透析性脑病 (DE)、Guam 帕金森痴呆等^[1,2], 这些疾病患者海马区铝含量显著高于正常人相应脑区的含量, 提示海马是铝主要作用部位之一。动物实验也发现铝可致大鼠痴呆, 不仅表现为学习记忆能力下降和行为障碍, 而且形态学改变与 AD 病理过程相似^[3]。铝的神经毒性已成为当前研究的热点之一。

铝对婴幼儿可能特别危险, 因为他们的血脑屏

障、胃肠道及肾脏功能发育还不完善^[4]。本研究采用整体动物实验的方法, 对刚断乳大鼠进行亚慢性染铝, 通过测定大鼠神经行为学、神经细胞形态学的变化, 探讨铝对发育中的中枢神经系统的影响, 以为阐明铝的神经毒性机制提供理论依据和实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及染毒

刚断乳 Wistar 大鼠 39 只, 体重 50~70 g, 由中国医科大学实验动物中心提供, 适应性饲养观察 1 周后使用。将动物按体重随机分为 3 组, 每组 13 只, 雌雄各半。所设各组分别为: 对照组 (给予蒸馏水)、低剂量组 (给予 0.2% $AlCl_3$ 水溶液)、高剂量组 (给予 0.4% $AlCl_3$ 水溶液); 实验动物均自由饮水、摄食, 连续染毒 12 周。动物室温度 18~23 °C,

收稿日期: 2008-04-28 修回日期: 2008-10-15

基金资助: 国家自然科学基金项目 (No. 30700675)

作者简介: 刘秋芳 (1959-), 女, 主管技师, 研究方向: 神经毒理。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

相对湿度 45% ~ 55%。

1.2 主要试剂与仪器

三氯化铝, 分析纯, 沈阳试剂三厂; 跳台装置, 中国安徽; 原子吸收光谱仪 (日立 Z-5000), 日本; 光学显微镜 (Olympus), 日本。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 动物处理 最后一次染毒 24 h后, 动物称重并记录。每组随机抽取 3只大鼠, 按 40 mg/kg体重用戊巴比妥钠麻醉后打开胸腔, 暴露心脏, 左心室进针, 打开右心耳, 用生理盐水行全身灌流。待将血液冲净后, 经 10%多聚甲醛灌注固定, 取全脑再固定于 10%多聚甲醛中, 用于形态学观察。各组中其他大鼠先做神经行为学测定, 后摘眼球采血, 继而脱颈椎处死, 取全脑, 称重; 分离海马, 称重; 血液用于铝含量测定。

1.3.2 一般自然情况观察 染铝期间, 观察各组动物的生长及体重变化情况, 每周在固定时间称量各组动物体重一次并记录。

1.3.3 脏器系数测定 脑组织系数 = 脑组织质量 (g) / 体重 (100g)

1.3.4 脑组织和血铝含量测定 准确称取各组大鼠脑样 0.2 g (或准确吸取肝素抗凝血 0.1 ml) 于石英烧杯中, 加 5~8 ml 混酸 (浓硝酸 高氯酸 = 4:1, V/V), 同时做空白对照。低温加热至试样全部溶解, 继续加热蒸发至近干。加 2%硝酸溶解残留物并定容至 50 ml 石墨炉原子吸收光谱法测定脑组织和血铝含量。

1.3.5 学习、记忆行为学测定 装置: 大鼠跳台箱 25 cm × 22 cm × 30 cm, 跳台四面为不透明的茶色玻璃,

底部为间隔为 1 cm 的铜栅 (可通 40 V 直流电给予刺激), 底部一角有一 8 cm × 8 cm × 8 cm 的平台。

学习行为测定: 先将大鼠轻放在铜栅上, 适应 3 min 后, 将大鼠放上平台, 等大鼠跳下后再将其放回平台上面, 如此重复 3 次, 然后给予持续电刺激 (约 40 V), 此时大鼠受到刺激后会自动跳上平台, 如此反复训练, 直至大鼠在平台上停留时间超过 5 min 为止。

记忆行为测定: 24 h 后, 按原来的次序将大鼠依次放在平台上, 记录大鼠自平台首次跳下的时间 (潜伏期) 及 5 min 内大鼠从平台上跳下的次数 (错误次数)。潜伏期越短、错误次数越多说明学习、记忆能力越差; 若大鼠在 5 min 后仍没有跳下平台, 则将其潜伏期记为 300 s。

1.3.6 海马病理切片的细胞形态学观察 海马组织石蜡包埋, 常规制成 4 μm 切片。采用 HE 染色、尼氏染色, 常规脱水、透明、树脂封片。光镜观察海马神经元数量、分布及形态改变; 尼氏染色观察神经元内尼氏体分布、数量及形态改变。

1.4 数据处理

用 SPSS 1.5 统计软件进行实验数据处理及统计分析, 组间差异的统计学检验用单因素方差分析, 两组间比较用 Q 检验 (Newman-Keuls)。其中血铝、脑铝浓度用几何均数表示。

2 结果

2.1 各组大鼠体重增长情况

由表 1 可见, 染铝各组大鼠出生后体重明显低于对照组, 但随着周龄增长, 这种差异逐渐减小。

表 1 各组大鼠体重增长比较 (x ± s)

组别	n	第一周	第二周	第三周	第四周
对照组	13	50.7 ± 10.2	79.5 ± 17.5	117.2 ± 21.5	172.1 ± 30.1
0.2% AlCl ₃ 组	13	45.4 ± 9.2*	70.4 ± 14.5	114.4 ± 28.9	167.1 ± 31.4
0.4% AlCl ₃ 组	13	34.5 ± 5.2*	54.0 ± 10.2*	113.6 ± 22.3	169.2 ± 38.0

与对照组比较, * P < 0.05 表 2 同。

2.2 各组大鼠体重与脑组织系数

如表 2 所示, 染铝组与对照组比较, 体重差异无统计学意义。高剂量染铝组脑组织系数显著低于对照组 (P < 0.05)。

表 2 各组大鼠体重及脑组织系数的比较 (x ± s)

组别	n	体重 (g)	脑组织系数 (%)
对照组	10	243.62 ± 23.15	0.495 ± 0.044
0.2% AlCl ₃ 组	10	271.87 ± 24.17	0.458 ± 0.026
0.4% AlCl ₃ 组	10	269.62 ± 24.47	0.431 ± 0.043*

2.3 各组大鼠血铝和脑铝浓度

如表 3 所示, 染铝组大鼠的血铝浓度均显著高于对照组 (P < 0.05), 且随着铝暴露剂量的增加, 血铝浓度呈现一定的升高趋势; 脑铝的变化趋势与血铝一致, 染铝组大鼠脑铝与对照组相比均显著升高 (P < 0.01), 低、高剂量组之间差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.4 学习、记忆 (神经) 行为学结果评价

表 4 显示, 随着染铝剂量的增加, 大鼠跳台试验的潜伏期逐渐缩短, 而错误次数逐渐增加, 与对照组

比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。0.2% $AlCl_3$ 组动物的潜伏期与 0.4% $AlCl_3$ 组比较差异也有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 各组动物血铝和脑铝浓度的比较 ($\bar{X} \pm s$)

组别	n	血铝 ($\mu g/L$)	脑铝 ($\mu g/g$)
对照组	10	33.89 ± 9.21	6.19 ± 2.27
0.2% $AlCl_3$ 组	10	47.43 ± 14.38*	15.68 ± 4.48**
0.4% $AlCl_3$ 组	10	55.56 ± 19.07*	18.79 ± 5.18** #

与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 与 0.2% $AlCl_3$ 组比较, # $P < 0.05$

表 4 各组动物潜伏期和 5 m^h 错误次数的比较 ($\bar{X} \pm s$)

组别	n	潜伏期 (s)	错误次数 (次)
对照组	10	300.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.2% $AlCl_3$ 组	10	202.71 ± 81.99**	1.43 ± 0.85**
0.4% $AlCl_3$ 组	10	19.67 ± 8.44** #	2.47 ± 0.99**

与对照组比较, ** $P < 0.01$ 与 0.2% $AlCl_3$ 组比较, # $P < 0.05$

2.5 各组海马病理组织学检查

HE染色, 与对照组相似, 海马细胞形态正常, 排列较整齐; 神经元的分布、数量及形态未见明显差别。而尼氏染色也未发现染铝组海马神经元内尼氏小体的数量及分布出现异常。提示在本次研究中, 海马细胞未发生在光镜下可见的明显改变。

3 讨论

到目前为止, 铝对学习记忆的抑制作用已在多数动物和人体上得到证实。1992年 White^[5]等调查了铝冶炼厂内接触铝粉尘 12~23年的 25名工人, 其中 21人出现了明显的记忆减退; 而后 Bast Petersen^[6]和 Hanninen^[7]等人报道了铝作业工人的视空间感知能力、心理运动能力、短期记忆能力、学习能力等均受到一定程度的损害; Yen-kood^[8]等人给小鼠腹腔注射 $AlCl_3$ 1个月后, 发现其条件回避反应率明显低于对照组。但亚慢性铝暴露对发育中的动物神经系统损伤研究较少, 在本次行为学实验中, 亚慢性染铝组大鼠随着染铝剂量的增加, 大鼠跳台试验的潜伏期逐渐缩短, 错误次数逐渐增加, 与对照组比较差异均有统计学意义; 0.2% $AlCl_3$ 组动物的潜伏期与 0.4% $AlCl_3$ 组比较差异也有统计学意义, 说明铝能损伤神经系统发育过程中大鼠的学习和记忆功能。

有学习、记忆障碍的老年性痴呆患者神经元数目明显减少, 海马颗粒空泡样变性 (GDV) 被认为是 Alzheimer病的特征性病理学改变^[9]。Crapper^[10]等发现铝可使神经元的核仁明显变小和数量明显减少。在

本次研究中, 无论是 HE还是尼氏染色均未发现染铝组大鼠海马细胞出现在光镜下可见的明显病理变化, 表明在本次实验条件下, 亚慢性铝暴露未对海马造成光镜下可见的器质性改变, 但还不能排除神经细胞可能发生了超微结构如细胞器、亚细胞器等的改变。

本研究还发现, 染铝各组仔鼠出生后体重明显低于对照组, 但随着周龄的增长, 这种差异逐渐减小。可能是因为越年幼的动物对铝越敏感。实验结束时, 高剂量染铝组脑组织系数显著低于对照组 ($P < 0.05$), 说明在生长发育期铝暴露会特异地影响大鼠大脑的发育。血铝和脑铝结果表明随着铝暴露剂量的增加, 血铝和脑铝的含量也逐渐升高, 脑铝低、高剂量组之间差异也存在统计学意义 ($P < 0.05$)。提示铝能穿过血脑屏障并在脑中沉积, 从而干扰脑内正常的离子代谢平衡, 对中枢神经系统和生长发育造成影响。

参考文献:

- [1] Flaten T P. Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease with emphasis on drinking water [J]. Brain Res Bull 2001; 55 (2): 187-196.
- [2] Rob PM, Niederstadt C, Reusche E. Dementia in patients undergoing long-term dialysis: aetiology, differential diagnoses, epidemiology and management [J]. CNS Drugs 2001; 15 (9): 691-699.
- [3] Platt B, Fiddler G, Riedel G, et al. Aluminum toxicity in the rat brain: histochemical and immunocytochemical evidence [J]. Brain Res Bull 2001; 55 (2): 50-53.
- [4] Maria L, Maria D M, Camina M, et al. Prenatal exposure to aluminum reduces expression of neuronal nitric oxide synthase and of soluble guanylate cyclase and impairs glutamatergic neurotransmission in rat cerebellum [J]. Journal of Neurochemistry 1999; 73 (2): 712.
- [5] White DM, Longstreet W T J, Rosenstock L, et al. Neurologic syndrome in 25 workers from an aluminum smelting plant [J]. Arch Intern Med 1992; 152 (7): 1443-1448.
- [6] Bast Petersen R B, Drablos P A, Giffers L O, et al. Neuropsychological deficit among elderly workers in an aluminum production [J]. Am J Ind Med 1994; 25: 649-662.
- [7] Hanninen H, Matikainen E, Kovalja T, et al. Internal load of aluminum and central nervous system function of aluminum welders [J]. Scan J Work Environ Health 1994; 20: 279-285.
- [8] Yen-kood H C. The effect of aluminum on conditioned avoidance (VCR) in mice [J]. Toxicol Ind Health 1992; 8 (1-2): 1-7.
- [9] Ball M J. IOP. Granulovacuolar degeneration in the aging brain and in dementia [J]. J Neuropath Exp Neurol 1997; 36: 474-487.
- [10] Crapper D R. Aluminum and the genetic apparatus in Alzheimer's disease: The aging brain and senile demontized by K [J]. Nandy Plenum Press 1997; 229-246.