

亚慢性铝染毒对转人载脂蛋白 E4 基因小鼠 β -淀粉样蛋白含量及低密度脂蛋白家族的影响

李亮, 薛星莉, 李亚芹, 李欢, 潘宝龙, 牛侨

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19565

摘要:

[背景] 铝是阿尔兹海默病的重要环境因素, 载脂蛋白 E4 基因 (*ApoE4*) 是阿尔兹海默病的重要遗传因素。近年来铝和 *ApoE4* 基因如何导致学习记忆损伤引起了广泛关注。铝和 *ApoE4* 基因分别对 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 清除和神经元突触可塑性的影响有待进一步研究。

[目的] 探究铝与 *ApoE4* 基因联合作用对小鼠 $A\beta$ 及载脂蛋白 E 受体 2 (*ApoER2*) 等低密度脂蛋白家族含量的影响。

[方法] 野生型和转人 *ApoE4* 基因型的 C57BL/6 小鼠各 16 只, 每种类型小鼠随机分为染铝组 [$40 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{Al}(\text{mal})_3$]、对照组 (生理盐水), 每组 8 只。染毒方式为腹腔注射, 每注射 5 d 停止 2 d, 染毒时间为 60 d。采用 Morris 水迷宫试验检测小鼠学习记忆能力, 以高尔基染色检测海马 CA1 区突触可塑性, 采用 Western blotting 法检测海马组织中 *ApoER2*、低密度脂蛋白受体相关蛋白 -1 (*LRP1*)、极低密度脂蛋白受体 (*VLDLRs*)、淀粉样前体蛋白 (*APP*) 的蛋白表达情况, 用 Elisa 方法检测海马中 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 蛋白含量。

[结果] Morris 水迷宫试验结果显示野生型小鼠对照组和染铝组、转 *ApoE4* 基因型小鼠对照组和染铝组染毒结束后第 1 天逃避潜伏期分别为 (48.56±18.31)、(46.77±19.91)、(45.13±19.07)、(46.81±18.04) s, 至染毒结束后第 5 天分别下降至 (19.43±13.28)、(27.03±17.47)、(21.27±20.17)、(30.06±20.02) s。方差分析显示, 染毒结束后第 4、5 天各组逃避潜伏期差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同类型小鼠对照组低于染铝组, 同处理条件下野生型小鼠低于转基因型小鼠, 但基因类型和铝之间交互作用无统计学意义 ($P > 0.05$)。野生型小鼠对照组和染铝组、转基因型小鼠对照组和染铝组穿越平台次数分别为 (2.86±0.99)、(1.88±0.64)、(2.63±0.77)、(0.50±0.53) 次, 基因类型和铝之间交互作用有统计学意义 ($P < 0.05$)。野生型小鼠对照组和染铝组、转基因型小鼠对照组和染铝组树突棘密度分别为每微米 (0.57±0.06)、(0.34±0.05)、(0.39±0.05)、(0.26±0.04) 个, 基因类型和铝之间交互作用有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 染铝与基因类型对 *ApoER2* 和 *LRP1* 的蛋白表达存在交互作用 ($P < 0.05$), 且均会导致 *ApoER2* 和 *LRP1* 蛋白表达下降, 对 *APP* 和 *VLDLRs* 的蛋白表达无交互作用 ($P < 0.05$)。Elisa 检测结果表明, β_{40} 蛋白表达在各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 $A\beta_{42}$ 蛋白表达在各组间差异有统计学意义, 且基因类型和铝之间存在交互作用 ($P < 0.05$)。

[结论] 铝和 *ApoE4* 基因对小鼠学习记忆能力存在一定程度的影响, 尤其是空间学习记忆能力。铝和 *ApoE4* 基因对海马 CA1 区突触可塑性可能存在交互作用, 表明铝和 *ApoE4* 基因联合作用可能对突触可塑性造成影响; 铝和 *ApoE4* 基因对 $A\beta$ 含量变化可能存在交互作用, 尤其是 $A\beta_{42}$ 含量的变化, 其原因可能是铝和 *ApoE4* 基因联合作用导致低密度脂蛋白家族中 *ApoER2* 和 *LRP1* 降低。

关键词: 麦芽酚铝; *ApoE4* 基因; $A\beta$; *ApoER2*

Effects of subchronic aluminum exposure on β -amyloid protein and low density lipoprotein family in transgenic mice with human apolipoprotein E4 gene Li Liang, XUE Xing-li, Li Ya-qin, Li Huan, PAN Bao-long, NIU Qiao (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] Aluminum is an important environmental risk factor for Alzheimer's disease, and *ApoE4* gene is an important genetic determinant of Alzheimer's disease. In recent years, how aluminum and *ApoE4* gene lead to learning and memory impairment has drawn wide attention. Aluminum and *ApoE4* gene play important roles in β -amyloid protein ($A\beta$) clearance and neuronal synaptic plasticity, which needs further exploration.

基金项目

国家自然科学基金面上项目 (8187120987)

作者简介

李亮 (1992—), 男, 硕士生;
E-mail: 630808777@qq.com

通信作者

牛侨, E-mail: niuqiao55@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-09-03

录用日期 2019-12-24

文章编号 2095-9982(2020)02-0103-08

中图分类号 R135

文献标志码 A

► 引用

李亮, 薛星莉, 李亚芹, 等. 亚慢性铝染毒对转人载脂蛋白 E4 基因小鼠 β -淀粉样蛋白含量及低密度脂蛋白家族的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (2): 103-110.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19565

Funding

This study was funded.

Correspondence to

NIU Qiao, E-mail: niuqiao55@163.com

Competing interests None declared

Received 2019-09-03

Accepted 2019-12-24

► To cite

Li Liang, XUE Xing-li, Li Ya-qin, et al. Effects of subchronic aluminum exposure on β -amyloid protein and low density lipoprotein family in transgenic mice with human apolipoprotein E4 gene[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(2): 103-110.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19565

[Objective] This experiment explores the effects of aluminum and *ApoE4* gene on the content of A β and the content of low density lipoprotein family, such as apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2), in mice.

[Methods] Sixteen wild type C57BL/6 mice and 16 transgenic mice with human *ApoE4* gene were included in this study. Both types of mice were randomly divided into aluminum exposure group [40 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ Al(mal)₃] and control group (normal saline) with 8 mice in each group. Intraperitoneal injection of Al(mal)₃ solution was successively performed for 5 d and rested for 2 d, and the exposure time was 60 d in total. The learning and memory ability of mice was detected with Morris water maze; the synaptic plasticity in CA1 area of hippocampus was detected with Golgi staining; the protein expressions of ApoER2, low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), very low density lipoprotein receptor (VLDLRs), and amyloid protein precursor (APP) in hippocampus were detected by Western blotting; and the levels of A β 40 and A β 42 proteins in hippocampus was detected by Elisa.

[Results] The results of Morris water maze showed that the escape latencies of the C57BL/6 control group, the C57BL/6 aluminum group, the *ApoE4* control group, and the *ApoE4* aluminum group on the first day after the end of exposure were (48.56 \pm 18.31), (46.77 \pm 19.91), (45.13 \pm 19.07), and (46.81 \pm 18.04)s, respectively; on the fifth day after the end of exposure, the results were decreased to (19.43 \pm 13.28), (27.03 \pm 17.47), (21.27 \pm 20.17), and (30.06 \pm 20.02)s, respectively. The results of analysis of variance showed that the differences of escape latency between groups were statistically significant on the fourth and fifth days after the end of exposure ($P < 0.05$); the control group showed lower values than the aluminum group, and the wild type C57BL/6 mice showed lower values than the *ApoE4* transgenic type mice; however, the interaction between genotype and aluminum was not statistically significant ($P > 0.05$). The frequencies of crossing the platform in the C57BL/6 control group, the C57BL/6 aluminum group, the *ApoE4* control group, and the *ApoE4* aluminum group were (2.86 \pm 0.99), (1.88 \pm 0.64), (2.63 \pm 0.77), and (0.50 \pm 0.53), respectively; the interaction between genotype and aluminum was statistically significant ($P < 0.05$). The densities of dendritic spines in the C57BL/6 control group and aluminum group as well as the *ApoE4* control group and aluminum group were (0.57 \pm 0.06), (0.34 \pm 0.05), (0.39 \pm 0.05), and (0.26 \pm 0.04) spines per μm , respectively; the interaction between genotype and aluminum was statistically significant ($P < 0.05$). Western blotting results showed that aluminum and *ApoE4* gene had interactions with ApoER2 and LRP1 protein expressions ($P < 0.05$), and both aluminum exposure and *ApoE4* genotype led to decreased expression levels of ApoER2 and LRP1 proteins, but had no interaction with APP or VLDLRs protein expressions ($P < 0.05$). The results of Elisa showed that there was an interaction between aluminum and *ApoE4* gene in A β 42 protein ($P < 0.05$), but not in A β 40 ($P > 0.05$).

[Conclusion] Aluminum and *ApoE4* gene interact with each other on learning and memory in mice, especially on spatial learning and memory ability. The interaction between aluminum and *ApoE4* gene on synaptic plasticity in hippocampal CA1 region indicates that the combined action may have an effect on synaptic plasticity. The interaction between aluminum and *ApoE4* gene on A β content, especially on A β 42 content, may be related to the decrease in ApoER2 and LRP1 of the low density lipoprotein family.

Keywords: maltol aluminum; *ApoE4* gene; A β ; ApoER2

铝是阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的一种重要环境致病因素^[1], 可通过影响络丝蛋白途径等, 对 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β) 的清除率造成影响。此外, 在铝的影响下, 淀粉样前体蛋白 (amyloid protein precursor, APP) 在 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用下形成游离的 A β ^[2-4]。络丝蛋白途径在介导细胞迁移及维持神经元突触正常功能中起着重要作用^[5-6]。在铝染毒肾上腺髓质嗜铬瘤细胞 (PC12) 的实验中发现, 络丝蛋白途径中的载脂蛋白 E 受体 2 (apolipoprotein E receptor 2, ApoER2) 和极低密度脂蛋白受体 (very low density lipoprotein receptor, VLDLRs) 含量均发生下降^[7-8]。ApoER2、VLDLRs、低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) 都是低密度脂蛋白家族成员, 而 LRP1 已被证实参与脑中 A β 的清除和转运^[9], 且体内低密度脂蛋白的改变会对载脂蛋白 E (ApoE) 表达造成影响^[10]。ApoE 是一种多态性蛋白, 参与脂蛋白代谢和转化过程。人类 *ApoE* 基因存在三种不同亚型 (E2、E3、E4), 各亚型构成比分别为 7.4%, 78.3%, 14.3%^[11], 而鼠类只存在一种 *ApoE* 类型, 其在结构上与人的 *ApoE3*

型更为接近^[12]。不同 *ApoE* 亚型引起的 AD 发生风险不同, 依次为 *ApoE4* > *ApoE3* > *ApoE2*^[13]。*ApoE* 基因与晚发型及散发型 AD 密切相关^[14], *ApoE* 引发 AD 可能与其能导致 A β 清除率降低有关^[7]。此外, 有研究表明 *ApoE4* 蛋白可与络丝蛋白竞争性结合位于神经元表面的 ApoER2, 促进其内吞, 降低突触可塑性, 增加 AD 发生风险^[15]。铝和基因是 AD 发生的重要外在和内在影响因素, 且在引起 AD 的某些途径中均发挥作用。本研究通过对野生型小鼠和转 *ApoE4* 基因型小鼠染铝, 探究铝和 *ApoE4* 基因是否会在 AD 的发展过程中发挥联合作用, 以及联合作用下对脂蛋白家族的影响。

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组

两种类型成年雄性小鼠均为 C57BL/6, 第一类为最初转人 *ApoE4* 型的 2 对小鼠 (JAX Stock Number: 004631) 繁殖后的 16 只子鼠, 并通过单核苷酸多态性分型测定确保稳定遗传人 *ApoE4* 基因; 第二类为 16 只野生型 C57BL/6 小鼠 (购自斯贝福北京生物技术有限公司)。每种类型小鼠随机分为染铝组和对照

组, 每组8只。小鼠体重为20~22g, 饲养于12h光暗循环(光照时间为8:00—20:00)的洁净动物房, 温度为(22±2)℃, 自由饮水饮食。山西医科大学动物实验中心提供标准化饲料。实验过程遵循国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》。

1.2 制备麦芽酚铝[Al(mal)₃]和动物分组及染毒

用灭菌三蒸水配置8mmol·L⁻¹的氯化铝溶液、24mmol·L⁻¹的麦芽酚溶液, 再将两种溶液等体积混合, 配制成终浓度为4mmol·L⁻¹的Al(mal)₃溶液, 用10%NaOH调节pH值为7.4。

小鼠适应性饲养一周后, 腹腔注射染毒, 染毒剂量为40μmol·kg⁻¹ Al(mal)₃, 每天称量体重, 按体重注射相应体积的4mmol·L⁻¹ Al(mal)₃溶液, 对照组注射同体积比的生理盐水, 每注射5d停止2d, 染毒时间为60d。

1.3 Morris水迷宫实验

实验装置为一个高45cm、直径100cm的圆形水池。根据水池内壁所标的东、西、南、北方位将水池分为4个象限, 将平台置于象限的中间位置, 淹没在水面下0.5~1cm。实验开始的前1天让每只小鼠试游60s, 以适应环境。正式实验前5天进行定位航行训练, 即设置时间为60s, 记录小鼠从入水到找到平台的时间。规定时间内未找到平台, 引导小鼠到平台上, 停留10s。第6天为空间探索实验, 将水池中的平台撤离, 记录小鼠在60s之内穿越平台次数。

1.4 高尔基染色

迅速取出脑组织, 切除脑组织视交叉之前的部分和小脑, 留取有海马的脑组织按高尔基染色试剂盒(Hitobiotec公司, 美国)说明书进行处理。染色结束后使用-80℃的异戊烷瞬时冷冻组织, 进行冰冻切片。调整冰冻切片机的温度为-19℃, 切片的厚度为80μm, 胶原切片载片。梯度脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。用光学显微镜(Olympus公司, 日本)进行观察和拍照。使用ImageJ软件进行分析。

1.5 Western blotting测定ApoER2、LPR1、VLDLRs、APP蛋白含量

蛋白组织抽提剂和蛋白酶抑制剂以99:1的比例配制组织裂解液。称量海马组织, 按20mg海马组织:200μL 1×组织裂解液的比例加入裂解液, 超声波匀浆仪破碎组织块, 冰上孵育30min使其充分裂解。12000×g, 4℃离心10min, 取上清。聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度, 以4:1比例在蛋白样品中加入5×上

样缓冲液备用。7%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白(上样量50μg), 内参为β-tublin。蛋白分离后将凝胶上的蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上, 一抗(1:1000)4℃孵育ApoER2, APP(1:5000), VLDLRs(1:500), LPR1(1:3000)过夜; 二抗(1:3000)37℃孵育2h, 所有一抗均购自英国Abcam公司, 二抗购自中国康为世纪有限公司。采用ECL发光试剂显影, 凝胶电泳分析系统采集信息。

1.6 Elisa法测定Aβ蛋白含量

于小鼠海马组织提取蛋白并定量。Elisa法操作步骤严格按照试剂盒(Develop公司, 中国)说明书进行。

1.7 统计学分析

所有的计量资料以均数±标准差表示, 采用SPSS 22.0软件进行统计分析。组间比较采用析因设计的方差分析, 检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 体重

染铝前后各组小鼠体重变化如图1所示, 染毒开始前各组体重基本保持一致, 野生型小鼠对照组和染铝组以及转基因型小鼠对照组和染铝组体重分别为(20.87±0.83)、(21.00±0.76)、(20.50±0.76)、(20.50±0.93)g。染毒结束后野生型对照组和染铝组以及转基因型对照组和染铝组体重分别为(28.75±1.67)、(27.62±1.69)、(28.50±1.41)、(27.38±1.85)g, 差异均无统计学意义(F=1.15, P=0.35)。

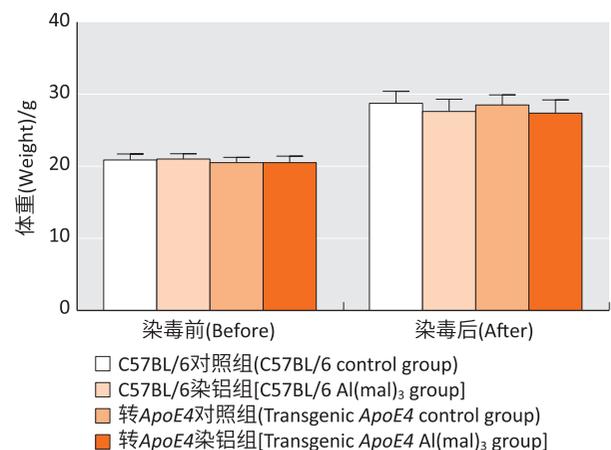


图1 染铝前后各组小鼠体重

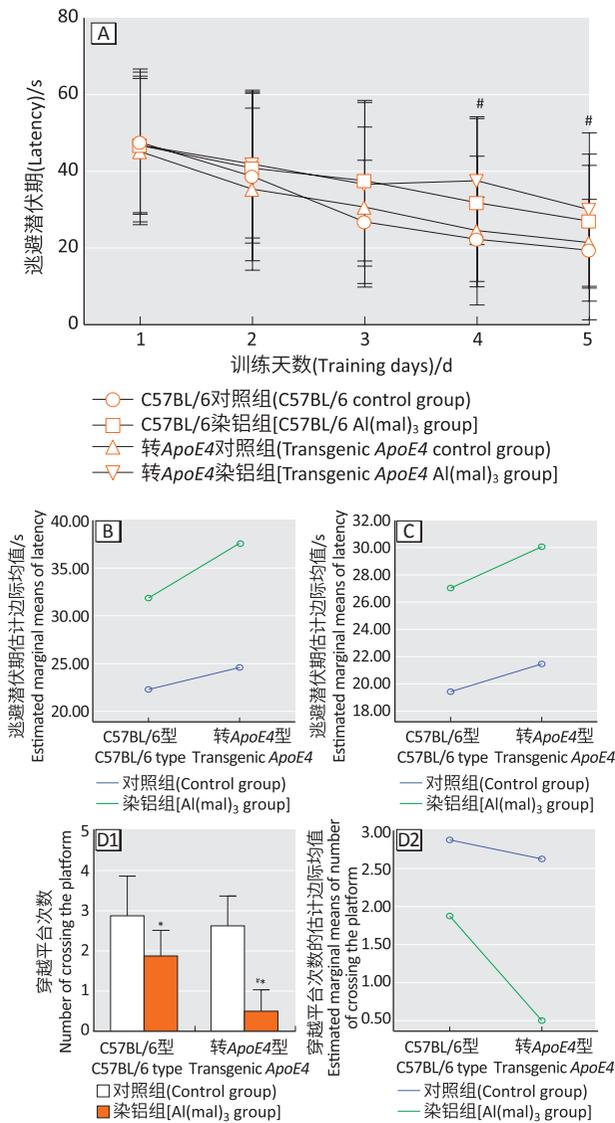
Figure 1 Body weights of mice before and after aluminum exposure

2.2 学习记忆功能变化

定位航行实验结果如图2A所示, 随着训练天数增加, 各组逃避潜伏期呈下降趋势, 且同处理条件下转

基因型的逃避潜伏期高于野生型。训练第4、5天, 方差分析结果显示组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但基因型和铝之间无交互作用 ($P > 0.05$), 见图2B、C。

空间探索实验结果如图2D1所示, 在采取相同处理时, 转ApoE4基因型小鼠穿越平台次数低于野生型, 且同类型小鼠染铝组穿越平台次数低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 基因类型和铝之间交互作用有统计学意义 ($F = 4.54, P = 0.04$, 图2D2)。



[注] A为逃避潜伏期; B、C分别为第4、5天交互作用结果; D为穿越平台次数(1)和交互作用结果(2)。* : 与同类型小鼠对照相比, $P < 0.05$; # : 与相同处理的C57BL/6型小鼠相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A is the result of escape latency; B and C are the interaction results on the 4th and 5th days, respectively; D shows the results of the number of crossing the platform (1) and interaction analysis (2), respectively. *: Compared with the control group of the same type of mice, $P < 0.05$; #: Compared with the C57BL/6 mice under the same exposure protocol, $P < 0.05$.

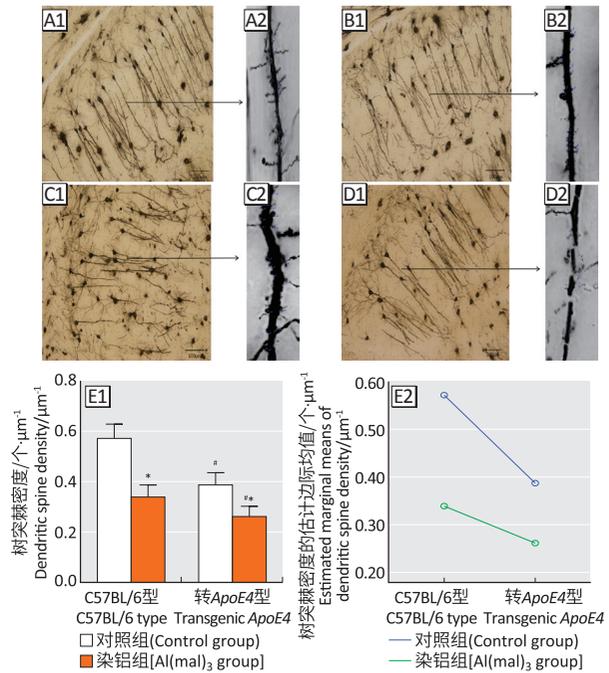
图2 水迷宫试验及其交互作用分析结果

Figure 2 Water maze results and interaction analysis results

2.3 神经元形态及树突棘密度

高尔基染色的脑组织切片在200倍光镜下和1000倍油镜下观察CA1区神经元, 野生型对照组(图3A)神经元相对完整, 野生型染铝组(图3B)和转基因型对照组(图3C)中均可见部分神经元结节状改变, 转基因型染铝组神经元出现广泛断裂(图3D)。

使用ImageJ软件计数CA1区神经元树突棘($n=9$), 并得出其密度(图3E1)。同类型小鼠对照组小鼠树突棘密度高于染铝组, 相同染铝条件下转ApoE4基因型小鼠树突棘密度低于野生型。方差分析结果显示差异有统计学意义 ($F = 65.28, P < 0.01$)。基因类型和铝之间交互作用有统计学意义 ($F = 10.74, P < 0.01$, 图3E2)。



[注] A、B、C、D分别表示C57BL/6对照组、C57BL/6染铝组、转ApoE4对照组、转ApoE4染铝组CA1区200倍(1)和1000倍(2)镜下神经元高尔基染色图片。E表示树突棘密度(1)及交互作用结果(2)。* : 与同类型小鼠对照相比, $P < 0.05$; # : 与相同处理的C57BL/6小鼠相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A, B, C, and D represent the C57BL/6 control group, the C57BL/6 aluminum exposure group, the ApoE4 control group, and the ApoE4 aluminum exposure group with Golgi staining, respectively [$\times 200$ (1) and $\times 1000$ (2)]; E represents dendritic spine density (1) and interaction analysis results (2); *: Compared with the control group of the same type of mice, $P < 0.05$; #: Compared with the C57BL/6 mice under the same exposure protocol, $P < 0.05$.

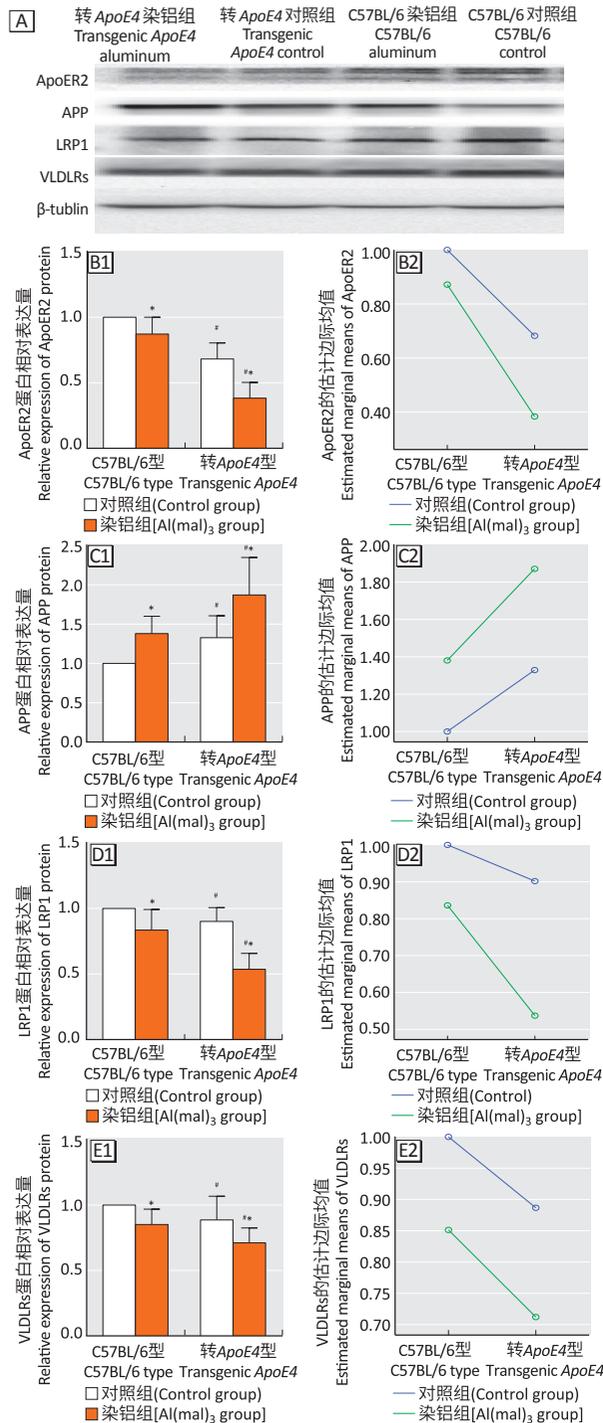
图3 高尔基染色切片和树突棘密度及其交互作用结果

Figure 3 Golgi staining specimens, dendritic spine density, and interaction analysis results

2.4 ApoER2、APP、LRP1、VLDLRs蛋白表达量

转ApoE4基因型小鼠对照组和染铝组的ApoER2蛋白相对表达量均低于相应野生型, 且同类型小鼠染

铝组 ApoER2 蛋白相对表达量低于对照组, 方差分析显示差异有统计学意义 ($F=56.33, P<0.01$); 基因类型和染铝之间存在交互作用 ($F=5.70, P=0.02$)。见图 4A、B。



[注] A 为蛋白条带, B、C、D、E 分别为 ApoER2、APP、LRP1、VLDLRs 蛋白表达量 (1) 及交互作用结果 (2)。* : 与同类型小鼠对照相比, $P<0.05$; # : 与相同处理的 C57BL/6 小鼠相比, $P<0.05$ 。

[Note] A shows protein bands, and B, C, D, and E show ApoER2, APP, LRP1, and VLDLRs protein expressions (1) and their interaction analysis results (2), respectively; * : Compared with the control group of the same type of mice, $P<0.05$; # : Compared with the C57BL/6 mice under the same exposure protocol, $P<0.05$ 。

图 4 各蛋白表达量及其交互作用结果

Figure 4 Expressions of proteins and interaction analysis results

转 ApoE4 基因型小鼠对照组和染铝组的 APP 蛋白相对表达量均高于相应野生型, 且同类型小鼠染铝组 APP 蛋白相对表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($F=13.11, P<0.01$); 基因类型和染铝之间无交互作用 ($F=0.66, P=0.42$)。见图 4A、C。

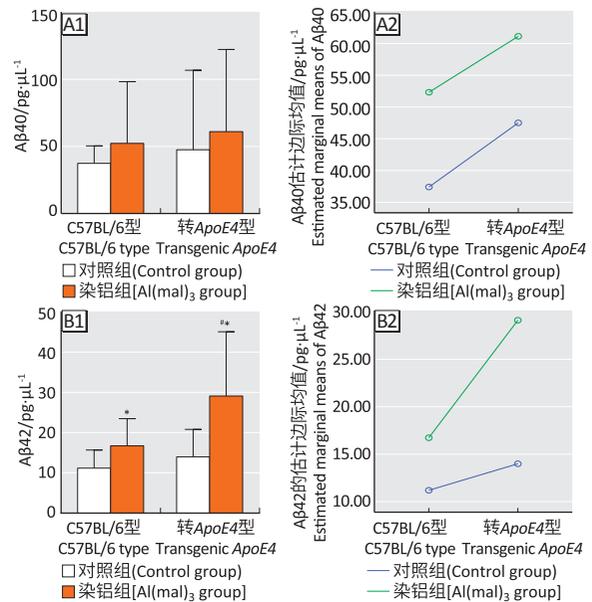
在相同处理下, 转 ApoE4 基因型小鼠的 LRP1 蛋白相对表达量低于 C57BL/6 型, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 基因类型和染铝之间存在交互作用 ($F=7.21, P=0.01$)。见图 4A、D。

在相同处理下, 转 ApoE4 基因型小鼠的 VLDLRs 蛋白相对表达量低于 C57BL/6 型, 同类型小鼠染铝组低于对照组 ($F=8.47, P<0.01$); 基因类型和染铝之间无交互作用 ($F=0.10, P=0.75$)。见图 4A、E。

2.5 Aβ40 和 Aβ42 蛋白表达量

Elisa 法测定结果显示, 各组间 Aβ40 含量差异无统计学意义 ($F=0.98, P=0.40$); 基因类型和染铝之间无交互作用 ($F<0.01, P=0.95$)。见图 5A。

在相同处理下, 野生型小鼠的 Aβ42 含量低于转 ApoE4 基因型, 且同类型小鼠染铝组高于对照组, 差异有统计学意义 ($F=16.37, P<0.01$); 基因类型和染铝之间交互作用有统计学意义 ($F=6.03, P=0.02$)。见图 5B。



[注] A、B 分别表示 Aβ40、Aβ42 蛋白表达量 (1) 及其交互作用结果 (2)。* : 与同类型小鼠对照相比, $P<0.05$; # : 与相同处理的 C57BL/6 小鼠相比, $P<0.05$ 。

[Note] A and B represent the expression levels of Aβ40 and Aβ42 proteins (1) and their interaction analysis results (2), respectively. * : Compared with the control group of the same type of mice, $P<0.05$; # : Compared with the C57BL/6 mice under the same exposure protocol, $P<0.05$ 。

图 5 Aβ40 和 Aβ42 蛋白表达量及其交互作用结果

Figure 5 Aβ40 and Aβ42 protein expression levels and interaction analysis results

3 讨论

铝不仅普遍存在于自然环境中,还广泛应用于生产生活环境中,其可以通过空气、水、食物等多种介质进入人体,并蓄积于各个部位。研究表明当脑内铝含量超出正常水平时,会表现出一定的神经毒性^[16-18]。大量实验表明铝在AD的发生发展中扮演着重要的角色^[19]。张立丰等^[20]研究表明,铝可引起海马CA1区神经元结构受损,可能与铝暴露导致学习记忆能力降低有关。铝还可影响ApoER2和LRP1蛋白表达,这两种蛋白在介导神经突触的正常维持和A β 的清除中起着重要作用^[21-23]。

麦芽酚是蔗糖水解或淀粉热降解产生的副产物,对人体无毒无害,常见于各类食品的加工中。Al (mal)₃在正常的生理pH条件下能够释放出大量的铝离子,具有较高的生物利用度,适合进行神经毒性研究^[24]。故本研究采用亚慢性腹腔注射麦芽酚铝的方式对小鼠进行染毒来探讨铝的神经毒作用。

本研究通过比较实验前后小鼠体重的变化发现,同类型染铝组小鼠与对照组小鼠体重差异无统计学意义,这表明麦芽酚铝的腹腔注射不会对小鼠的正常生长造成影响。相同处理下野生型C57BL/6型小鼠与转ApoE4基因型小鼠相比,体重差异也无统计学意义,表明两种类型小鼠在生长发育方面并无差异。

Morris水迷宫是用来测试啮齿类动物学习记忆的常用方法。逃避潜伏期反映小鼠学习能力,穿越平台次数反映小鼠空间记忆能力。本研究发现铝与ApoE4基因在小鼠逃避潜伏期中交互作用虽无统计学意义,但在铝和ApoE4基因共同作用下,小鼠的逃避潜伏期最高。铝与ApoE4基因在小鼠空间探索中交互作用有统计学意义,且铝和ApoE4基因联合作用下,小鼠的穿越平台次数最低。水迷宫的结果说明铝和ApoE4联合作用对小鼠的学习记忆存在一定程度的影响。

ApoE基因位于人类染色体19q13.2, E3型的rs7412和rs42935位点的碱基为T和C, E2型的rs7412位点为T, E4型rs42935位点为C^[25-26]。近年来,人群中ApoE4基因引起认知功能障碍问题已有广泛研究,大量研究表明ApoE4是认知功能障碍发生的独立危险因素^[27-28]。有研究表明与ApoE3型相比, ApoE4型树突棘密度更低^[29],这与本研究在高尔基切片中观察到的现象一致,且铝和ApoE4基因对树突棘密度有交互作用,提示铝和ApoE4基因联合作用对小鼠的突触可塑性存在影响。Strittmatter等^[14]通过实验发现, A β 的沉积量

与人体内的ApoE4表达量存在剂量反应关系。在各种病因导致的AD中普遍存在A β 沉积^[30]。目前研究认为,与过多A β 清除相关的主要是低密度脂蛋白受体家族^[31-33]。本次研究发现,铝和ApoE4基因对低密度脂蛋白家族中的ApoER2和LRP1存在交互作用,为铝和ApoE4对A β 的干扰机制研究提供了可能。本课题组前期研究^[34]发现,PC12细胞中, ApoE4基因与染铝对A β 42蛋白含量有交互作用,与本研究在动物体内研究结果相一致。

采用连接酶法对转人ApoE4小鼠基因型进行测定,结果显示小鼠均稳定遗传了人ApoE4基因。本研究的局限性在于虽然转ApoE4基因小鼠与野生型小鼠均属于C57BL/6型,但转ApoE4基因小鼠是从国外实验室购买,与本研究所使用的野生型C57BL/6型小鼠非同产地,可能影响实验的可比性。

综上所述,铝和ApoE4基因在AD的发生发展中有着重要作用,且他们对突触可塑性、A β 沉积及低密度脂蛋白受体家族都有各自的影响,但铝和ApoE4基因是否有协同作用尚不明确。铝和ApoE4基因在小鼠空间学习记忆、海马神经元突触可塑性、ApoER2和LRP1蛋白表达及A β 42蛋白的沉积中可能存在交互作用。虽然无交互作用,但铝和ApoE4基因单独作用对APP和VLDLRs蛋白的表达量存在影响。推测铝和ApoE4在空间学习记忆和突触可塑性上的交互作用可能与ApoER2受体和LRP1受体有关,其具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] AUSTROM MG, LU Y. Long term caregiving : helping families of persons with mild cognitive impairment cope [J] . Curr Alzheimer Res, 2009, 6 (4) : 392-398.
- [2] DI CARLO M, GIACOMAZZA D, SAN BIAGIO P L. Alzheimer's disease : biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools [J] . J Phys Condens Matter, 2012, 24 (24) : 244102.
- [3] GONSALVES D, JOVANOVIC K, DA COSTA DIAS B, et al. Global Alzheimer research summit : basic and clinical research : present and future alzheimer research [J] . Prion, 2012, 6 (1) : 7-10.
- [4] WANG L, HU J, ZHAO Y, et al. Effects of aluminium on β -amyloid (1-42) and secretases (APP-cleaving enzymes) in rat brain [J] . Neurochem Res, 2014, 39 (7) : 1338-1345.

- [5] ROGAEV EI, SHERRINGTON R, ROGAEVA EA, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene [J]. *Nature*, 1995, 376 (6543) : 775-778.
- [6] SHERRINGTON R, FROELICH S, SORBI S, et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5 (7) : 985-988.
- [7] HOLTZMAN D M, HERZ J, BU G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors : normal biology and roles in Alzheimer disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (3) : a006312.
- [8] 梁瑞峰. 亚慢性铝暴露影响A β 生成在铝致神经行为损伤中的作用 [D]. 太原 : 山西医科大学, 2012.
- [9] BERTRAM L, MCQUEEN M B, MULLIN K, et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies : the AlzGene database [J]. *Nat Genet*, 2007, 39 (1) : 17-23.
- [10] FRYER J D, DEMATTOS R B, MCCORMICK L M, et al. The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (27) : 25754-25759.
- [11] WEISGRABER K H. Apolipoprotein E : structure-function relationships [J]. *Adv Protein Chem*, 1994, 45 : 249-302.
- [12] PHILLIPS M C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism [J]. *IUBMB Life*, 2014, 66 (9) : 616-623.
- [13] SCHMECHEL D E, SAUNDERS A M, STRITTMATTER W J, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (20) : 9649-9653.
- [14] STRITTMATTER W J, WEISGRABER K H, HUANG D Y, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide : isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (17) : 8098-8102.
- [15] DAMOISEAUX J S, SEELEY W W, ZHOU J, et al. Gender modulates the APOE ϵ 4 effect in healthy older adults : convergent evidence from functional brain connectivity and spinal fluid tau levels [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (24) : 8254-8262.
- [16] MIRZA A, KING A, TROAKES C, et al. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 40 : 30-36.
- [17] VIRK S A, ESLICK G D. Aluminum levels in brain, serum, and cerebrospinal fluid are higher in Alzheimer's disease cases than in controls : a series of meta-analyses [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2015, 47 (3) : 629-638.
- [18] EXLEY C, VICKERS T. Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium : a case report [J]. *J Med Case Rep*, 2014, 8 : 41.
- [19] LESTAEVEL P, BENSOUSSAN H, RACINE R, et al. Transcriptomic effects of depleted uranium on acetylcholine and cholesterol metabolisms in Alzheimer's disease model [J]. *C R Biol*, 2011, 334 (2) : 85-90.
- [20] 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.
- [21] THENMOZHI A J, RAJA T R W, JANAKIRAMAN U, et al. Neuroprotective effect of hesperidin on aluminium chloride induced Alzheimer's disease in Wistar rats [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40 (4) : 767-776.
- [22] 桂兰润, 王振福. Reelin相关基因研究进展 [J]. *国外医学遗传学分册*, 2005, 28 (6) : 325-328.
- [23] PETIT-TURCOTTE C, AUMONT N, BEFFERT U, et al. The apoE receptor apoER2 is involved in the maintenance of efficient synaptic plasticity [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26 (2) : 195-206.
- [24] BHARATHI, VASUDEVARAJU P, GOVINDARAJU M, et al. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration [J]. *Indian J Med Res*, 2008, 128 (4) : 545-556.
- [25] HIXSON J E, VERNIER D T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI [J]. *J Lipid Res*, 1990, 31 (3) : 545-548.
- [26] PAIK Y K, CHANG D J, REARDON C A, et al. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82 (10) : 3445-3449.
- [27] FARLOW M R, HE Y, TEKIN S, et al. Impact of APOE in mild cognitive impairment [J]. *Neurology*, 2004, 63 (10) : 1898-1901.
- [28] 张洁, 周晓辉, 罗坤. 中国人群轻度认知功能障碍与载脂蛋白E基因多态性相关性的Meta分析 [J]. *临床荟萃*, 2016, 31 (3) : 315-321.

- [29] LIRAZ O, BOEHM-CAGAN A, MICHAELSON D M. ApoE4 induces A β 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement ApoE4 mice [J]. *Mol Neurodegener*, 2013, 8 : 16.
- [30] RYAN S D, WHITEHEAD S N, SWAYNE L A, et al. Amyloid- β 42 signals tau hyperphosphorylation and compromises neuronal viability by disrupting alkylacylglycerophosphocholine metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (49) : 20936-20941.
- [31] KUMAR-SINGH S. Hereditary and sporadic forms of a β -cerebrovascular amyloidosis and relevant transgenic mouse models [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10 (4) : 1872-1895.
- [32] HAYES C D, DEY D, PALAVICINI J P, et al. Chronic cladribine administration increases amyloid beta peptide generation and plaque burden in mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10) : e45841.
- [33] KANEKIYO T, BU G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6 : 93.
- [34] ZHANG T, WANG S, NIU Q. Effect of aluminum-maltolate on the content of A β protein and the expression of ApoER2, VLDLRs, and LRP1 in PC12-ApoE4 cells [J]. *Neurotox Res*, 2019, 35 (4) : 931-944.
- (英文编辑：汪源；编辑：韩凤婵，汪源；校对：丁瑾瑜)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》再次入选 “中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”

由上海市卫生健康委员会主管，上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办的《环境与职业医学》于2019年11月再次入选“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。在此，编辑部全体人员谨向全体编委、专家及广大作者和读者表示衷心的感谢，希望大家一如既往地关心、支持杂志的发展，并提出宝贵的意见与建议。

《环境与职业医学》杂志编辑部
2020-02-25

