

铝对 *apoE* 基因敲除小鼠认知能力及相关蛋白的影响

李美琴, 郭卫力, 张勤丽, 牛侨*

摘要: [目的] 研究三氯化铝侧脑室注射对 *apoE* 基因敲除小鼠空间学习和记忆能力的影响及相关蛋白代谢型谷氨酸受体-1 (mGluR1) 的表达。[方法] 取经跳台试验、避暗试验和 Morris 水迷宫试验筛选的正常 *apoE* 基因敲除小鼠, 用随机数字表法按体重随机分为 2 组: 对照组和 0.5% 三氯化铝染铝组, 每组 8 只。染铝组经侧脑室注射染毒, 3 μ L/d, 连续 5 d; 对照组以相同容量生理盐水注射, 染毒期结束后从第 15 天开始用跳台试验、避暗试验和 Morris 水迷宫试验判断 2 组的认知能力; 染毒期结束 20 d 后断头取脑组织, 用 Western-blot 方法对 mGluR1 蛋白进行定量检测。[结果] 染铝组跳台和避暗潜伏期较对照组明显缩短 ($P < 0.05$); 第 2 天错误次数明显增多 ($P < 0.05$); Morris 水迷宫试验结果显示, 染铝组找到平台的潜伏期较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 而空间探索试验中在目标象限停滞时间明显减少 ($P < 0.05$)。染铝组 mGluR1 表达量较对照组降低, 且差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。[结论] 铝可致 *apoE* 基因敲除小鼠学习和记忆能力障碍, 且可使 mGluR1 蛋白的表达降低。

关键词: 铝; 认知能力; 代谢型谷氨酸受体-1; Western-blot; *apoE* 基因

The Effect of Aluminum Chloride on Cognitive Ability and Related Protein in *apoE* Knock Out Mice
LI Mei-qin, GUO Wei-li, ZHANG Qin-li, NIU Qiao* (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shangxi 030001, China). *Address correspondence to NIU Qiao; E-mail: niuqiao55@163.com

Abstract: [Objective] To investigate the effects of aluminum chloride ($AlCl_3$), which was administrated by lateral cerebral ventricle injection, on spacial learning and memory in *apoE* knock out mice, as well as their expression of metabotropic glutamate receptor-subtype 1 (mGluR1). [Methods] After being successfully trained by step through test, step down test and morris water maze (MWM), 16 mice were evenly and randomly divided into 2 groups: control group and exposed group. Mice in the latter group were treated with 0.5% $AlCl_3$ by lateral ventricle injection for 5 d, 3 μ L/d, while the controls were treated with normal saline in the same volume as the exposed group. Cognitive ability was evaluated by step through test, step down test and MWM on the 15th day after Al treatment for 5 d. Cerebral cortex was taken from the mice on 20th day after 5 d Al treatment. mGluR1 in cytoplasm was detected by western-blot, images were collected respectively by gelatum analyzing system and scanner. Data were analyzed by the gelatum analyzing system. [Results] Latent period of step down test and step through test in the exposed group were significantly decreased ($P < 0.05$), the error count was significantly increased in the second day ($P < 0.05$) compared with the control group. In MWM the time of place navigation was significantly increased ($P < 0.05$), and the time of spatial probe was significantly shortened ($P < 0.05$) compared with the control group. The expression of mGluR1 was significantly decreased in the 0.5% $AlCl_3$ exposed group compared with the control group ($P < 0.05$). [Conclusion] The learning and memory ability and the expression of mGluR1 in *apoE* knock out mice are decreased obviously by $AlCl_3$ lateral ventricle injection.

Key Words: aluminum; cognitive ability; mGluR1; Western-blot; *apoE* gene

铝可在体内蓄积, 而神经系统是铝毒作用的最主要靶器官。实验表明, 铝可引起动物脑组织细胞坏死、神经元纤维变性 (NFD) 及神经元纤维缠结 (NFT)^[1-3] 等病变, 这可能与引起阿尔茨海默病 (AD) 有关。近年来发现, *apoE* 基因多态性与 AD 发病有密切关系^[4], 所以本项目选用 *apoE* 基因敲除的小鼠造铝致痴呆模型。谷氨酸 (Glu) 是脑内主要的兴奋性递

质, 谷氨酸受体可分为离子型谷氨酸受体和代谢型谷氨酸受体 (mGluRs), 其中 mGluR1 属于 I 组代谢型谷氨酸受体。mGluRs 在学习记忆损伤和 AD 发病中扮演十分重要的角色^[5]。

为了进一步研究铝致 *apoE* 基因缺陷小鼠认知能力改变, 本实验拟选用 *apoE* 基因敲除雄性小鼠进行染铝, 观察其认知能力改变, 探讨 *apoE* 基因敲除雄性小鼠与对照组的认知能力的差别。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30671777)

[作者简介] 李美琴 (1982-), 女, 硕士生; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: limeiqin123@163.com

[*通信作者] 牛侨教授, E-mail: niuqiao55@163.com

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

从北京大学医学院实验动物中心购买健康成年 *apoE* 基因敲除雄性小鼠 16 只, 体重 25~30g (6 月龄), 活动能力相近, 在动物室适应性喂养 1 周后, 按体重随机分为 2 组, 每组 8 只, 即每日

侧脑室注射生理盐水的对照组和每日注射三氯化铝的染铝组。

1.2 主要试剂

结晶氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (sigma-aldrich), 生理盐水、BCA 蛋白定量试剂盒、脱脂奶粉、发光液(北京普利莱基因技术有限公司), goat-anti mGluR1 的一抗、mouse-anti GAPDH、兔抗山羊 IgG/生物素标记、抗小鼠 IgG/生物素标记及辣根酶标记链酶卵白素(中杉金桥)。

1.3 主要仪器

ZH-蓝星立体定位仪(淮北正华生物仪器设备有限公司); 10 μL 微量进样器、水迷宫(中国医学科学院药物研究所 DMS-2); 摇床(北京市六一仪器厂沃德生物医学仪器公司); 电泳仪、转膜仪(BIO-RAD); X 线胶片洗片机、捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.4 染毒方法

将 *apoE* 基因敲除小鼠用质量分数为 5% 水合氯醛溶液麻醉, 置于脑立体定位仪上, 剪开前囟周围头皮并刮去骨膜, 以两眼珠连线为底边作等边三角形, 以其顶点旁开 2~2.5 mm 为注射位点, 进针深度为 3 mm。对照组给生理盐水 3 μL ; 染铝组给 0.5% 的三氯化铝溶液 3 μL , 连续给药 5 d, 隔天腹腔注射青霉素抗感染。注射过程中注意无菌操作, 整个染毒期间, 动物室以自然节律采光, 温度 18~23 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 40%~60%, 清洁、安静。所有动物饲以普通饲料, 自由饮水和进食。

1.5 神经行为测试

1.5.1 跳台试验 染毒结束后第 15 天, 采用跳台法对 2 组小鼠进行学习记忆能力测试。实验时, 先将动物放入反应箱内适应 2 min, 然后立即通电, 动物受到电击后表现为逃避反应即跳上平台。多数动物会再次或多次跳至铜栅上, 受到电击后又迅速跳回平台, 如此训练 5 min。24 h 后, 在底部铜栅通电的情况下, 直接将动物置于平台上, 记录从小鼠被放上平台到第 1 次跳下的时间, 称为潜伏期(LT), 小鼠受电击后会逃避性的跳上平台, 然后记录 5 min 内小鼠再次跳下的次数 1(EN1), 再过 24 h (第 2 天), 同样在通电情况下记录 5 min 内小鼠跳下平台的次数 2(EN2), 以 LT、EN1 和 EN2 共同作为学习记忆成绩。

1.5.2 避暗试验 染毒结束后第 15 天, 采用避暗法对各组小鼠进行学习记忆能力测试。实验时, 先将动物放入有机玻璃避暗实验箱内适应 2 min, 实验箱分明、暗两室, 两室间有一直径 4 cm 的圆孔相沟通, 室底均布有可通电的铜栅。利用小鼠喜暗的习性, 将小鼠背对暗室的洞口放入明室, 并开始计时, 小鼠很快进入暗室, 此时接通暗室电源, 给予直流电电击小鼠, 其会逃出暗室, 如此训练 5 min。24 h 后, 在暗室铜栅通电的情况下, 将动物置于明室, 记录小鼠从明室第 1 次进入暗室的时间, 称为 LT, 小鼠受电击后会逃避性地跑出暗室, 然后记录 5 min 内小鼠进入暗室的次数(EN1), 再过 24 h (第 2 天), 同样在通电情况下记录 5 min 内小鼠进入暗室的次数(EN2), 以

LT、EN1 和 EN2 共同作为学习记忆成绩。

1.5.3 Morris 水迷宫试验 染毒结束后第 15 天进行 Morris 水迷宫试验。圆形水池直径为 100 cm, 高 75 cm, 平台高度 50 cm, 直径 10 cm, 平台低于水面 1 cm, 水温(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机, 计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。实验期间迷宫外参照物保持不变。定位导航试验(place navigation): 小鼠连续接受 4 d 训练, 每天 4 次, 每次间隔 20 min, 记录小鼠分别从 4 个不同象限入水点入水找到平台所需的时间, 即逃避到平台上的潜伏期(escaping latency)。4 次潜伏期成绩的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如果小鼠在 1 min 内未找到平台, 其潜伏期按 1 min 计算。空间探索试验(spatial probe test): 实验第 5 天撤除平台, 从任一入水点将小鼠面向池壁放入水中, 记录 60 s 内小鼠的游泳轨迹, 观察分析小鼠停留目标象限的时间。

1.6 mGluR1 的测定

染毒期结束 20 d 后断头取脑组织, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 测定时取冷冻的脑组织 0.01 g 加入细胞裂解液, 冰上超声破碎细胞, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 15 min, 离心半径 5 cm, 取上清, BCA 试剂盒进行蛋白浓度的测定, 之后调整蛋白浓度至同一浓度, 测量调整好浓度的蛋白样品的体积, 然后与 2 倍浓度的上样缓冲液按体积比 1:1 混匀, 94 $^{\circ}\text{C}$ 水浴煮沸 5 min。每孔上样 50 μg , 10% 的 SDS-PAGE 分离样品, 80 V 电压电泳 2 h 左右。湿式转膜, 恒流 400 mA, 40 min 将蛋白转至 PVDF 膜上, 用 5% 的牛奶封闭液封闭 3 h 以上, 一抗 1:1000 稀释 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 20 min/次, 生物素标记二抗 1:2000 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 20 min/次, 1:2000 的卵白素稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 20 min/次, ECL 显色。另 mGluR1 与 GAPDH 蛋白的抗体稀释倍数相同, 其中 GAPDH 是内参蛋白(甘油醛脱氢酶)。采用捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对蛋白印迹方法(Western-blot)的结果进行分析, 然后计算 mGluR1 与 GAPDH 蛋白光密度(D)的比值, 比较 2 组 $D_{\text{mGluR1}}/D_{\text{GAPDH}}$ 比值的大小。

1.7 资料处理

全部数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS 13.0 分析软件分析, 2 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 AlCl_3 对基因敲除小鼠学习和记忆能力的影响

小鼠侧脑室末次注射 AlCl_3 后第 15 天进行小鼠跳台试验和水迷宫试验, 结果见表 1。表 1 显示, 染铝组跳台潜伏期和避暗潜伏期较对照组明显缩短($P < 0.05$); 第 2 天错误次数明显增多($P < 0.05$)。Morris 水迷宫试验结果显示, 染铝组在定位导航中找到平台的潜伏期较对照组明显延长($P < 0.05$); 而空间探索试验中在目标象限停滞时间明显减少($P < 0.05$)。

表 1 两组小鼠神经行为测试结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of AlCl_3 exposure on the abilities of learning and memory in mice (Mean \pm SD, $n=8$)

组别 Group	跳台实验(Step through test)			避暗实验(Step down test)			Morris 水迷宫实验(Morris water maze)	
	LT(s)	EN1(次)	EN2(次)	LT(s)	EN1(次)	EN2(次)	定位导航(s) X Place navigation)	空间探索(s) X Spatial probe test)
对照组(Control)	273.34 \pm 24.44	2.33 \pm 0.57	0.67 \pm 0.57	248.00 \pm 46.60	2.00 \pm 1.00	0.67 \pm 0.57	27.89 \pm 4.61	23.00 \pm 13.02
染铝组(Exposure)	132.67 \pm 65.03*	2.50 \pm 1.04	2.00 \pm 0.89*	170.16 \pm 65.97*	3.17 \pm 1.61	1.84 \pm 0.75*	49.59 \pm 9.08*	9.73 \pm 2.04*

[注]*: 与对照组相比(Compared with the control group), $P < 0.05$ 。

2.2 mGluR1 的表达

小鼠侧脑室末次注射 $AlCl_3$ 后第 20 天断头取脑组织, -80 冻存, 检测时取出, 用 Western-blot 方法对代谢型谷氨酸受体-1 (mGluR1) 蛋白进行定量检测。图 1 中 mGluR1 为目的蛋白, GAPDH 为内参, 其中 C 代表对照组, S 代表染铝组, 由图可见染铝组较对照组大脑皮质 mGluR1 蛋白总量表达有降低趋势。表 2 数据显示染铝组大脑皮质的 mGluR1 蛋白总量较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。

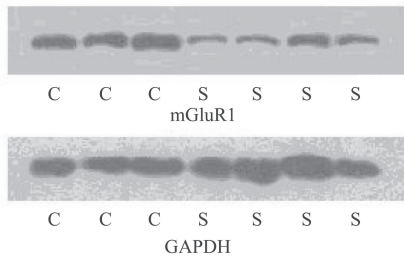


图 1 mGluR1 蛋白的表达
Figure 1 Expression of mGluR1

表 2 两组 mGluR1 蛋白的变化

Table 2 Expression of mGluR1 after $AlCl_3$ exposure

组别 (Group)	例数 (n)	mGluR1 ($\bar{x} \pm s$)
对照组 (Control)	8	0.81 ± 0.12
染铝组 (Exposure)	8	0.37 ± 0.08**

[注]*: 与对照组相比 (Compared with the control group), $P < 0.01$ 。

3 讨论

铝是自然界含量丰富的金属元素之一, 具有神经毒性, 可通过转铁蛋白受体和另一种更快的转运体系从血液入脑, 虽然可能以柠檬酸铝的形式从脑内排出, 但有部分铝长期滞留, 导致铝在脑内慢性蓄积^[6]。铝可影响神经递质系统、促进不溶性 β 淀粉样蛋白 (A β) 和过磷酸化微管相关蛋白 (Tau 蛋白) 的形成和积聚等, 进而影响学习记忆^[7] 且与老年性痴呆 (AD) 的发生存在密切的关系^[8]。学习记忆是脑的高级功能, 是构成智能的要素, 可分为获得、巩固及再现 3 个基本神经过程。检测学习记忆功能的实验方法有多种, 但 Morris 水迷宫法、跳台法及避暗法是运用得比较多且是经典的检测学习记忆功能的方法^[9]。

载脂蛋白 E (apoE) 是一种多功能蛋白, 关于它在 AD 病理机制方面发挥的作用尚不清楚。尽管如此, 有许多研究提示, apoE 与 AD 有关, 在这种退行性变的疾病发生过程中扮演了重要角色^[10]。apoE 基因敲除小鼠被作为一种新型动物模型应用于研究 apoE 缺失在乙酰胆碱神经损害所致认知障碍过程中发挥的作用^[11]。

本研究结果显示 $AlCl_3$ 侧脑室注射可导致认知能力的损伤, $AlCl_3$ 染铝组跳台和避暗潜伏期较对照组明显缩短; 第 2 天错误次数明显增多, 由此可以看出 apoE 基因敲除小鼠三氯化铝模型组被动回避记忆的能力降低, 可能是对于被动回避的长时记忆造成损伤; Morris 水迷宫试验中定位导航试验潜伏期较对照组显著增加, 空间探索试验的潜伏期显著减少, 提示 $AlCl_3$ 侧脑室注射可导致空间学习和记忆能力的障碍。

mGluR1 在神经系统中参与了介导兴奋性神经信号传导;

参与了学习和记忆过程中的突触传递^[12], 有研究表明 I 类 mGluRs 的活化可增加损伤诱导的神经元死亡, 其原因可能是 mGluR1 的活化可促进细胞内 Ca^{2+} 的释放, 导致 Ca^{2+} 超载, 进而造成神经元损伤, 所以 mGluR1 表达增加与加重脑损伤引起神经元死亡有关^[13-14]。本研究结果显示模型组 apoE 基因敲除小鼠大脑皮质中 mGluR1 蛋白表达量较对照组显著下降。从机制上讲 mGluR1 活化减少不会造成神经元的损伤, 但神经行为检测结果显示染铝组认知能力较对照组显著降低, 原因可能是 apoE 基因的缺失在 $AlCl_3$ 侧脑室注射 apoE 基因敲除小鼠中致 mGluR1 蛋白表达过程中发挥了作用, 但具体的机制尚有待进一步的研究; 在行为上侧脑室注射铝溶液使 apoE 基因敲除小鼠认知能力降低可能是由多种作用途径导致的。

参考文献:

- [1] CRAPPER DR, KRISHNAN SS, QUITTKAT S. Aluminum, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease [J]. Brain, 1976, 99(1): 67-80.
- [2] CRAPPAR DR, KRISHNAN SS, DALTON AJ. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration [J]. Science, 1973, 180(85): 511-513.
- [3] TERRY RD. The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1963, 22(10): 629-642.
- [4] 李栋, 刘元华, 董选, 等. Alzheimer 病 ApoE 基因多态性研究 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2003, 23(1): 30-32.
- [5] 吴俊芳, 刘恣. 现代神经科学研究方法 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2006: 695-717.
- [6] 王清华, 杨丹, 蔡际群, 等. mGluR1 在自发性癫痫大鼠海马中表达 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1143-1146.
- [7] 牛桥, 牛丕业, 何淑嫦. 天麻对铝致大鼠学习记忆障碍的影响 [J]. 卫生研究, 2004, 33(1): 45-48.
- [8] MEYER-BARON M, SCHÄPER M, KNAPP G, et al. Occupational aluminum exposure: Evidence in support of its neurobehavioral impact [J]. Neurotoxicology, 2007, 28(6): 1068-1078.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 826-828.
- [10] 况伟宏, 李进, 王雪, 等. ApoE 4 等位基因与阿尔茨海默病海马萎缩之间关系的研究 [J]. 华西医学, 2004, 19(4): 533-534.
- [11] 杨秀丽, 张文高, 郑广娟. 幼龄 ApoE 基因敲除小鼠认知功能障碍的行为学观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(1): 17-19.
- [12] 曹芳丽, 涂海军, 刘剑峰. mGluR1/5 介导的下游信号通路 [J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(2): 136-139.
- [13] McDONALD JW, FIX AS, TIZZANO JP, et al. Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S, 3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist [J]. J Neuro Sci, 1993, 13(10): 4445-4455.
- [14] 何远东, 费舟, 章翔, 等. 大鼠脑损伤后大脑皮层代谢型谷氨酸受体 Ia 的表达变化及意义 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(7): 612-615.

(收稿日期: 2008-12-29)

(编辑: 徐新春; 校对: 王晓宇)