

亚慢性铝暴露对大鼠脑内视黄酸受体 α 调节解聚素和金属蛋白酶-10分泌酶的影响

胡佳丽, 王林平, 牛侨

摘要: [目的] 探索铝对视黄酸受体 α (RAR α)调节解聚素和金属蛋白酶-10(α -ADAM10)分泌酶机制的影响。[方法] 取40只健康雄性SD大鼠,按体质量随机分为4组:溶剂对照(生理盐水)、低剂量组(Al^{3+} 0.4 mg/kg·d)、中剂量组(Al^{3+} 0.8 mg/kg·d)和高剂量组(Al^{3+} 1.2 mg/kg·d),腹腔注射染毒,每连续5 d,休息2 d,共2月。处死大鼠,分别取大脑皮质和海马,保存于 -80°C 。采用石墨炉原子吸收法检测各组铝含量,Western blot法检测RAR α 和 α -ADAM10分泌酶的表达。[结果] 随着染毒剂量的增加,各组大鼠脑皮质、海马中铝的蓄积量均明显上升;与0.0 mg/kg组相比,0.4 mg/kg及以上浓度致 α -ADAM10表达明显下降($P<0.05$),呈剂量-效应关系;与0.0 mg/kg组相比,0.4 mg/kg及以上浓度致皮质RAR α 表达呈明显下降趋势($P<0.05$)且呈剂量-效应关系,而海马RAR α 表达仅1.2 mg/kg剂量组明显低于其他组且有统计学差异($P<0.05$)。[结论] 大鼠经铝亚慢性染毒后,铝可能通过抑制RAR α 途径,从而进一步使 α -ADAM10分泌酶受到抑制,影响其在脑内的表达。

关键词: 麦芽酚铝;视黄酸受体 α ;解聚素和金属蛋白酶-10;皮质;海马;亚慢性染毒

Effects of Subchronic Exposure to Aluminum on Retinoic Acid Receptors- α Regulation of a Disintegrin and Metalloproteinase-10 in Rat Brain HU Jia-li, WANG Lin-ping, NIU Qiao (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China). Address correspondence to NIU Qiao, E-mail: niuqiao55@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the role of aluminum in the regulation of a disintegrin and metalloproteinase-10 (α -ADAM10) via retinoic acid receptors- α (RAR- α). [Methods] Healthy male SD rats ($n=40$) were randomly divided by weight into four groups: control group (saline), low-dose group (Al^{3+} 0.4 mg/kg·d), mid-dose group (Al^{3+} 0.8 mg/kg·d), and high-dose group (Al^{3+} 1.2 mg/kg·d) by intraperitoneal injection for five consecutive days per week in a period of two months. Rats were neutralized at the end of the two-month exposure, and cerebral cortex and hippocampus samples were dissected from each rat and stored at -80°C . Graphite furnace atomic absorption spectrometry was used to detect aluminum content. Western blot was used to determine the expressions of RAR- α and α -ADAM10. [Results] With the exposure dose increasing, the aluminum contents in cerebral cortex and hippocampus were significantly increased. Compared with the 0.0 mg/kg group, α -ADAM10 expression was significantly decreased in the 0.4 mg/kg and above groups in a dose-response manner ($P<0.05$). A decreasing trend was also observed for RAR- α expression in cerebral cortex in the groups treated with 0.4 mg/kg and more in a dose-response manner ($P<0.05$), while only the 1.2 mg/kg group showed a significant decrease in RAR- α expression in hippocampus compared with the other groups ($P<0.05$). [Conclusion] Aluminum may inhibit α -ADAM10 secrete enzymes expression through blocking RAR- α in rats with subchronic exposure to aluminum.

Key Words: aluminum maltol; retinoic acid receptors- α ; a disintegrin and metalloproteinase-10; cerebral cortex; hippocampus; subchronic exposure

铝是地壳中含量最多的金属元素,因其优良的性能而广泛应用于各个行业,随着铝及其化合物在日常

生活、生产中应用的增加,从多个途径进入体内的铝也会逐渐增加,造成的健康危害也越来越多^[1-2]。铝作为一种慢性神经毒物,可以引起动物脑内产生老年斑的前期改变 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein)沉积,但其机制尚不完全明确。解聚素和金属蛋白酶-10(a disintegrin and metalloproteinase-10, α -ADAM10)是淀粉样蛋白前体(amyloid protein precursor, APP)最终能否生成 β -淀粉样蛋白的直接决定因素之一^[3],近

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0043

[基金项目] 阿尔兹海默病动物模型的基因治疗及试剂盒的开发(编号: 2011-重点3)

[作者简介] 胡佳丽(1988—),女,硕士生;研究方向:铝对神经系统的影响;E-mail: hujialiqh@126.com

[通信作者] 牛侨, 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 030001

年来研究证实视黄酸受体家族 (retinoic acid receptors, RARs) 可以增加 α -ADAM10 分泌酶的表达, 增加 APP 被 α -ADAM10 分泌酶的分解, 减少 β -淀粉样蛋白沉积。那么铝对脑内的神经毒性是否通过 RARs 受体途径产生尚不明确, 本研究选取 SD 大鼠用麦芽酚铝亚慢性染毒, 观察铝是否通过 RARs 中的主要受体 RAR α 途径对 α -ADAM10 分泌酶进行调节, 为铝与 β -淀粉样蛋白沉积机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器设备

氯化铝 (纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich); 麦芽酚 (纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich); 硝酸 (优级纯, 中国天津市风船化学试剂科技有限公司); 30% 过氧化氢 (中国天津市北辰方正试剂厂); 铝标准液 (中国天津傲然精细化工研究所); 蛋白抽提试剂盒、蛋白定量试剂、超强信号显影剂 (中国康为试剂公司); RAR α 一抗 (Cell Signaling, 美国); α -ADAM10 一抗 (Abcam, 美国); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、鼠和山羊抗兔二抗 (中国康为试剂公司); 微波消解仪 (P YNN, 美国); 电热板 (Botonyc, 美国); 石墨炉 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 超声波细胞粉碎机 (中国上海跃进医疗器械一厂); 高速冷冻离心机 (中国上海力申科学仪器有限公司); 多功能酶联免疫检测仪 (Molecular Divices, 美国); 电泳仪、转膜仪 (中国北京六一仪器厂); 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, 美国); 压片暗盒 (中国北京普利来基因技术有限公司); 胶片 (中国厦门柯达公司); 凝胶分析系统 (中国江苏捷达公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型 选择 40 只健康清洁级雄性 SD 大鼠, 山西医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (晋) 2009-0001。体质量 180~200 g, 按体质量随机分为四组: 溶剂对照 (生理盐水)、低剂量组 (Al^{3+} 0.4 mg/kg·d)、中剂量组 (Al^{3+} 0.8 mg/kg·d) 和高剂量组 (Al^{3+} 1.2 mg/kg·d)。将 AlCl_3 用生理盐水溶解, 并将麦芽酚溶解于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 将上述溶液等体积混合, 配置染毒终浓度。用碳酸氢钠 (NaHCO_3) 调 pH 值为 7.4, 抽滤灭菌后, 以 1 mL/kg 注射剂量进行腹腔注射染毒, 每连续 5 d, 休息 2 d, 共 2 月。隔天对各组大鼠以青霉素抗感染。笼具、饮水瓶等所有用具, 均不使用含铝制品^[4]。

1.2.2 脑组织中铝测定 (1) 样品制备。在冰上迅速断头处死大鼠, 取大脑皮质和海马 0.2 g (湿重), 置于微波消解仪配置的消解管中, 加入 8 mL 混酸 (6 mL 硝酸+2 mL 过氧化氢), 放置 24 h 过夜。微波消解, 消解后样品呈黄豆样大小浅黄色液体。于电热板上 120℃ 无白烟为止。用 0.5 g/L 稀硝酸定容至 0.4 mL。上述消解所有用具均经过 5% 硝酸浸泡 48 h。经纯净水反复冲洗后烘干备用。(2) 石墨炉原子吸收法测定脑铝。校正曲线用线性最小二乘法拟合法, 将铝标准液配置 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 机器自动梯度稀释为: 0.00、10.00、20.00、30.00、40.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 可接受拟合 0.99。光谱仪设置: 重复测量 2 次, 测量时间 3 s、波长 309.3 nm, 电流 80%, 通带 0.5 nm, 信号峰面积, 瞬间峰测量 0.00~3.00 s, 背景校正四线氘灯。(3) 脑铝含量的计算。
$$\text{脑铝含量 (mg/kg)} = (A - A_0) \times V \times 1000 / (m \times 1000)$$
式中, A —消化液中检测的铝质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$); A_0 —空白液中检测的铝质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$); V —样品消化液的总体积 (L); m —样品的质量 (g)。

1.2.3 免疫印迹法对蛋白的测定 (Western blot) 分析大鼠脑皮质和海马部位的 RAR α 和 α -ADAM10 分泌酶的表达: 取出在 -80℃ 低温冰箱冻存的脑组织, 称取适量 (100 mg), 充分匀浆后, 加入组织蛋白抽提试剂, 于冰上超声破碎细胞并低温孵育 15 min, 4℃ 离心取上清, 采用 BAC 蛋白定量试剂盒于酶标仪上测定浓度后调整蛋白至同一浓度水平。加入等量的 2 倍浓度的上样缓冲液, 95℃ 水浴煮沸 5 min, 制备为待测样品。上样体积 20 μL (总量 50 μg), 用 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳样品 80 V 恒压 3 h。湿式转膜, 恒流 400 mA, 1.5 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上。室温下, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。5% 脱脂奶粉稀释一抗, 目的: RAR α (1:1000)、 α -ADAM10 分泌酶 (1:2000); 内参: GAPDH (1:5000), 4℃ 过夜; 0.02 mol/L 磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 漂洗条带 4 次, 15 min/次。加二抗, 目的: RAR α (1:5000) 兔、 α -ADAM10 分泌酶 (1:5000) 兔; 内参: GAPDH (1:4000) 鼠, 37℃ 孵育 2 h; 再次用 PBST 漂洗条带 4 次, 15 min/次。暗室显影。用捷达凝胶分析系统分析条带的灰度值。以目的和内参吸光度比值作为目的蛋白的相对含量。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件, 实验数据为计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 对数据进行单因素方差分析、组间比较用 LSD- t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脑铝

随着染毒剂量的增加, 各组大鼠脑皮质、海马中铝含量均明显上升, 呈剂量-效应关系, 见表 1。

表 1 各组大鼠二部位脑铝含量(mg/kg)

Table 1 Levels of aluminum in two brain areas in rats exposed to various dosages of aluminum

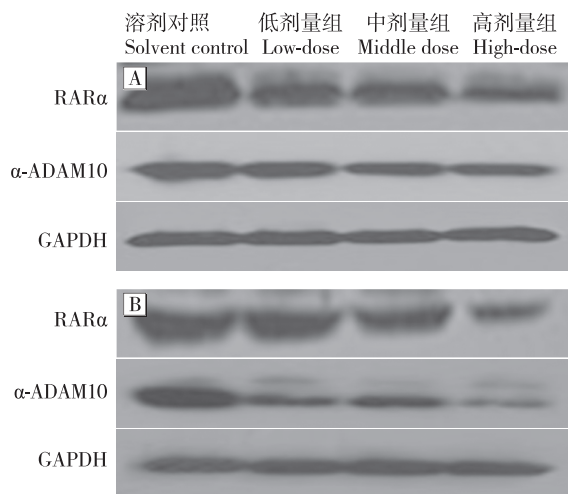
染毒剂量组(Al ³⁺ , mg/kg)	皮质(Cortex)	海马(Hippocampus)
0.0	11.95 ± 1.71	13.66 ± 4.21
0.4	47.68 ± 2.75*	50.06 ± 0.65*
0.8	73.79 ± 2.14**	80.15 ± 2.34**
1.2	94.65 ± 2.00***	110.25 ± 1.61***
<i>F</i>	82.475	74.065
<i>P</i>	0.0002	0.0006

[注] 与 0.0mg/kg 组比较, *: *P*<0.05。与 0.4mg/kg 组比较, #: *P*<0.05。与 0.8mg/kg 组比较, &: *P*<0.05。

[Note] Compared with the 0.0 mg/kg group, *: *P*<0.05. Compared with the 0.4 mg/kg group, #: *P*<0.05. Compared with the 0.8 mg/kg group, &: *P*<0.05.

2.2 RARα 和 α-ADAM10 分泌酶蛋白

随着染毒剂量的增加, 各组大鼠皮质和海马中 α-ADAM10 表达明显下降, 呈剂量-效应关系; 皮质 RARα 表达呈明显下降趋势, 而海马 RARα 表达仅高剂量组明显低于其他组, 见图 1、表 2。



[注] RARα: 视黄酸受体 α; α-ADAM10: 解聚素和金属蛋白酶-10; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

[Note] RARα: Retinoic acid receptors-α; α-ADAM10: A disintegrin and metalloproteinase-10; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

图 1 大鼠皮质(A)和海马(B)中 RARα 受体和 α-ADAM10 分泌酶蛋白 Western blot 图

Figure 1 Western blot pictures of RAR-α and α-ADAM10 in the cerebral cortex and hippocampus of rat brains

表 2 各组大鼠 RARα 和 α-ADAM10 分泌酶蛋白表达

Table 2 The expression levels of RARα and α-ADAM10 in two brain areas of rats exposed to various dosages of aluminum

染毒剂量组(Al ³⁺ , mg/kg)	皮质(Cortical)		海马(Hippocampus)	
	视黄酸受体 α Retinoic acid receptors -α	解聚素和金属 蛋白酶-10 A disintegrin and metalloproteinase-10	视黄酸受体 α Retinoic acid receptors -α	解聚素和金属 蛋白酶-10 A disintegrin and metalloproteinase-10
0.0	0.86 ± 0.18	1.35 ± 0.45	0.51 ± 0.14	1.07 ± 0.23
0.4	0.69 ± 0.17*	1.12 ± 0.30*	0.47 ± 0.07	0.86 ± 0.22*
0.8	0.58 ± 0.09*	0.96 ± 0.28**	0.45 ± 0.08	0.81 ± 0.23**
1.2	0.53 ± 0.15**	0.86 ± 0.26***	0.24 ± 0.86***	0.59 ± 0.30***
<i>F</i>	7.701	5.892	12.972	7.130
<i>P</i>	0.0066	0.0016	0.0001	0.0007

[注] 与 0.0mg/kg 组比较, *: *P*<0.05。与 0.4mg/kg 组比较, #: *P*<0.05。与 0.8mg/kg 组比较, &: *P*<0.05。

[Note] Compared with the 0.0 mg/kg group, *: *P*<0.05. Compared with the 0.4 mg/kg group, #: *P*<0.05. Compared with the 0.8 mg/kg group, &: *P*<0.05.

3 讨论

视黄酸(RA)是维生素 A 在体内主要的活性代谢产物, 在哺乳动物大脑生长发育过程中, 视黄酸信号系统在中枢神经系统的神经细胞增殖抑制和终末分化中起关键作用, RA 也就被认为是一种神经营养素^[5-6]。RA 通过视黄酸核受体家族(RARs)介导调节细胞分化, 视黄酸核受体家族(RARs)分为 RARα、RARβ 和 RARγ 三个亚型^[7]。研究发现, 发育中的大脑皮质、海马以及纹状体中视黄酸受体表达水平较高, 是胚胎神经系统发育的重要信号分子, 参与神经模式发育、神经细胞分化等; 在成年大脑中参与神经干细胞增殖, 组织修复再生, 维持神经细胞的状态。

近年来一些研究表明, 神经退行性病变如阿尔茨海默症等与维生素 A 类物质缺乏或不正常代谢有关, 并且发现补充维生素 A 会改善阿尔茨海默症的一些症状^[8-9]。有研究用 SH-SY5Y、THP-1、HePG2、HEK293 细胞系从基因水平均得出视黄酸受体对 α-ADAM10 分泌酶调节作用的推论。而视黄酸核受体家族(RARs)中的 RARα 受体分布广泛, 并且对海马和皮质有高水平的贡献^[10]。实验显示, 通过抑制剂阻断 RARα, 可使得脑内 LTP 诱发水平下降, 记忆受损^[11]。同时实验证实一些金属离子和有机物如: 苯、砷、铁、二噁英等物质, 均可作用于视黄酸受体, 影响视黄酸在机体内生理生化作用, 其中二噁英通过视黄酸途径引起记忆障碍^[12]。

本实验结果表明, 亚慢性腹腔注射麦芽酚铝染毒

可以使铝由血液系统经过血脑屏障在脑内蓄积,使脑铝含量随着染毒剂量的增加而升高,与先前的研究结果一致^[13]。本研究发现,随着亚慢性染铝剂量增大,大鼠脑皮质和海马的RAR α 和 α -ADAM10分泌酶表达均有所下降($P<0.05$)。其中在皮质部位低剂量的染毒可使得RAR α 的表达受到抑制,而海马部位的RAR α 只有高剂量Al³⁺的蓄积才能受到影响。但是不论在皮质还是海马,低剂量的Al³⁺染毒便可以使 α -ADAM10分泌酶受到损伤。结果提示,铝的神经毒性可能是因为Al³⁺抑制了RAR α 受体表达,从而进一步抑制了在 β -淀粉样蛋白溶解途径中起关键作用的 α -ADAM10分泌酶的表达。RAR α 蛋白表达的降低,使 α -ADAM10分泌酶分解APP为羧基末端的83个氨基酸(C83)片段和可溶性淀粉酶前体蛋白 α (α -secretase released APP ectodomain, sAPP α)的能力降低,阻碍了 β -淀粉样蛋白溶解途径的发生,造成脑内老年斑的形成和记忆损伤。

本次实验仅研究了视黄酸核受体家族(RARs)之一的RAR α 受体,至于铝离子是否可以影响RAR β 和RAR γ 受体作用于 α -ADAM10分泌酶,影响 β -淀粉样蛋白溶解途径尚有待于进一步研究。同时,需要建立细胞模型,添加激动剂RA特异的调节RARs途径,探索铝通过该途径调节 α -ADAM10分泌酶的表达。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] KREWSKI D, YOKEL RA, NIEBOER E, et al. Human health risk assessment for aluminum, aluminum oxide, and aluminum hydroxide[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2007, 10(Suppl 1): 1-269.
- [2] KUMAR V, GILL K D. Aluminum neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects[J]. Arch Toxicol, 2009, 83(11): 965-978.
- [3] KAWAHAARA M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases[J]. J Alzheimers Dis, 2005, 8(2): 171-182, 209-215.
- [4] LIANG RF, LI WQ, WANG XH, et al. Aluminium-maltolate-induced impairment of learning, memory and hippocampal long-term potentiation in rats[J]. Ind Health, 2012, 50(5): 428-436.
- [5] MALIK MA, BLUSZTAJN JK, GREENWOOD CE. Nutritional factors as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid[J]. J Nutr Biochem, 2000, 11(1): 2-13.
- [6] MEY J, MECAFFERY P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates[J]. Neuroscientist, 2004, 10(5): 409-421.
- [7] MANGELSDORF DJ. Vitamin A receptors[J]. Nutr Rev, 1994, 52(2 Pt 2): S32-S44.
- [8] VERMA AK, SHOEMAKER A, SIMSIMAN R, et al. Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin A-deficient diet[J]. J Nutr, 1992, 122(11): 2144-2152.
- [9] ZHAO X, PATTON JR, DAVIS SL, et al. Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator[J]. Mol Cell, 2004, 15(4): 549-558.
- [10] JIAN W, WEN E Y, GONG M, et al. The pattern of retinoic acid receptor expression and subcellular, anatomic and functional area translocation during the postnatal development of the rat cerebral cortex and white matter[J]. Brain Res, 2011, 1382: 77-87.
- [11] NOMOTO M, TAKEDA Y, UCHIDA S, et al. Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity[J]. Mol Brain, 2012, 5: 8.
- [12] BROUILLETTE J, QUIRION R. The common environmental pollutant dioxin-induced memory deficits by altering estrogen pathways and a major route of retinol transport involving transthyretin[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(2): 318-327.
- [13] BHARATHI, SHAMASUNDAR NM, SATHYANARAYANA RAO TS, et al. A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model[J]. Brain Res Rev, 2006, 52(2): 275-292.

(收稿日期: 2013-11-01)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)