· 实验研究 ·

NMDAR 在亚慢性染铝致大鼠学习记忆损害中作用*

刘莹,宋静,段蕾,牛侨

摘 要:目的 探讨 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)在亚慢性染铝致大鼠学习记忆损害中作用。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 36 只,按体重随机分为对照组、低、中、高剂量麦芽酚铝[$Al(mal)_3$]组(0.41、0.81、1.23 mg/kg),腹腔注射染毒 8 周后,用 Morris 水迷宫试验检测大鼠空间学习记忆能力,苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠海马组织病理变化,Western-blot 方法检测大鼠海马组织 NMDAR 亚单位 NR-2A、NR-2B 表达。**结果** 中、高剂量组大鼠找到平台时间分别为(44.12 ± 5.62)、(45.92 ± 13.97)s,均长于对照组的(26.80 ± 1.59)s($P < 0.05$);中、高剂量染铝组大鼠在目标象限停留时间均明显减少($P < 0.05$);随着铝剂量增加,大鼠海马锥体层细胞排列分散,细胞数目减少,出现核固缩、空泡变性等病理改变;与对照组 NR-2A 蛋白表达水平(0.69 ± 0.03)比较,中、高剂量组表达水平[(0.44 ± 0.12)、(0.32 ± 0.19)]均明显降低($P < 0.05$),且呈剂量效应关系;与对照组比较,各剂量染铝组大鼠 NR-2B 蛋白水平变化不明显。**结论** 亚慢性染铝可使大鼠学习记忆能力下降,其机制可能与大鼠海马 NMDAR 亚基蛋白表达改变有关。

关键词:N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR);铝;学习记忆;海马
中图分类号:R 114 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-0580(2013)07-1007-03 DOI:10.11847/zgggws2013-29-07-21

Role of NMDA receptor in damage of learning and memory induced by sub-chronic aluminum exposure

LIU Ying, SONG Jing, DUAN Lei, et al (*Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province* 030001, China)

Abstract: Objective To study the role of N-methyl-D-asparate (NMDA) receptor in the damage of learning and memory induced by sub-chronic aluminum exposure in rats. **Methods** Thirty-six healthy male adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal saline, low, moderate, and high dose aluminium exposure group (0.41, 0.81, and 1.23 mg/kg·bw). The rats were exposed to $Al(mal)_3$ with intraperitoneal injection for 8 weeks. After the exposure, Morris water maze test was performed to test the learning and memory abilities of the rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to observe pathologic changes of hippocampus. The expression of NMDA receptor in hippocampus was detected with western blot. **Results** The time of platform-finding was prolonged for the rats in moderate and high dose exposure group (44.12 ± 5.62 s, 45.95 ± 13.97 s) compared to that of rats in low dose exposure group (29.86 ± 10.34 s) ($P < 0.05$). The dispersed arrangement, decreased cell nnmber, nuclei atrophy, and vacular degeration were observed in hipocapal pyramida cells of the rats with high dose aluminum exposure. Compared to that of the normal saline group, NMDAR receptor 2A protein of the rats in moderate (0.44 ± 0.12) and high dose exposure group (0.32 ± 0.19) was significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-response manner. Compared to that of the control group, the expression of NMDA receptor-2B subunits protein was not significantly different in aluminum exposure groups. **Conclusion** Sub-chronic aluminum exposure could induce learning and memory damage in rats and its mechanisms may be associated with the chancg of NMDAR subunits protein expression.

Key words: NMDA receptor; aluminum; learning and memory; hippocampus

铝由于优良的理化特性被广泛应用于生产生活中,可使大鼠出现学习记忆障碍[1]。N-甲基-D-天门冬氨酸受体((N-methyl-aspartate receptor, NMDAR)是一种配体门控离子通道蛋白,其中 NR2 亚基作为调节亚基,包括 2A ~ 2D 共 4 种亚型,完整的 NMDAR 至少含有 1 个 NR2 亚基[2]。NR-2A 和 NR-2B 调节中枢神经系统的突触可塑性,对学习记忆产生影响。麦芽酚铝[$Al(mal)_3$]是氯化铝($AlCl_3$)和麦芽酚在中性条件下形成的稳定螯合物,进入机体后可明显提高铝在大脑内的吸收和蓄积[3]。本研究采用 $Al(mal)_3$ 对大鼠进行染毒,通过观察行为学改变、海马 NMDAR-2A、2B 受体变化,探讨铝致大鼠学习记忆障碍机制,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 麦芽酚、$AlCl_3$(美国 Sigma 公司),组织蛋白抽提剂、组织蛋白酶抑制剂、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京康为世纪有限公司),小鼠抗 NMDAR-2A、2B 多克隆抗体(美国 Millipore 公司)。$Al(mal)_3$ 溶液按 Langui 等[4]方法临用时现配,并用 0.22 μm 滤膜抽滤;20% 氢

* **基金项目:**国家自然科学基金(30972512);国家青年科学基金(81202182)
作者单位:山西医科大学劳动卫生教研室,山西 太原 030001
作者简介:刘莹(1987 -),女,山西交城人,硕士在读,研究方向:化学物的神经毒性。
通讯作者:牛侨,E-mail:niuqiao55@163.com

氧化钠调 pH 值至 7.4。Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所),DYCZ-24 系列双垂直蛋白电泳仪、转膜仪(北京六一仪器厂)。

1.2　*实验动物及分组*　健康成年雄性 SD 大鼠[山西医科大学实验动物中心,许可证号:SXCK(晋):2009—0001]36 只,体重 210 ~ 250 g,在动物室适应性喂养 1 周后,按体重随机分为 4 组:对照组(生理盐水)、低、中、高剂量 Al(mal)$_3$组(0.41、0.81、1.23 mg/kg)。动物室自然采光,温度 18 ~ 24 ℃,相对湿度 45% ~ 55%,保持清洁、安静。所有动物给以普通饲料,自由饮水和进食。采用腹腔注射方式对大鼠进行染毒,注射容量0.1 mL/100 g,连续染毒5 d,休息2 d,持续 8 周。

1.3　*指标及方法*

1.3.1　Morris 水迷宫试验　试验时将水位控制在平台下 1 cm,水温保持(22 ± 2)℃。迷宫上方安置摄像机,计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。试验前 1 d 将大鼠放入水池中(不含平台)自由游泳 2 min,使其熟悉迷宫环境。(1)定位航行试验:试验历时 5 d,每天 4 次,每次间隔 15 ~ 20 min。从池壁 4 个象限的中点将大鼠放入水池,记录大鼠找到平台时间,4 次找到平台时间平均值作为当日最终成绩进入最后统计。若大鼠在 120 s 内找不到平台,即将其引上平台,让大鼠在平台上停留 10 s,其潜伏期按 120 s 计算。(2)空间探索试验:第 5 d 进行空间探索试验,撤除平台,将受试大鼠在西北象限池壁中点面向池壁放入水中,记录 120 s 内大鼠穿越平台次数作为大鼠记忆成绩。

1.3.2　大鼠海马组织病理形态学观察　水迷宫实验结束后麻醉大鼠,其中一部分大鼠开胸暴露胸腔,用 0.9% 生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注固定,至大鼠四肢僵硬为止。分离两侧大脑半球,用 10% 中性甲醛固定,常规脱水透明,浸蜡包埋制成石蜡切片,进行苏木精—伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,封片后在显微镜下观察并照相;剩余大鼠立即分离大鼠海马组织冻存于 -80℃冰箱待用。

1.3.3　NMDAR 亚单位蛋白水平测定　将冷冻海马组织 100 mg 加入组织蛋白抽提剂,冰上超声破碎组织,于 4 ℃,10 000 g 离心 15 min 取上清,用 2,2 - 联喹啉 -4,4 - 二甲酸二钠蛋白浓度测定试剂盒进行总蛋白定量,与等体积的 2 倍上样缓冲液混匀,沸水浴煮沸 5 min。每孔上样 50 μg,8% 聚丙烯酰胺凝胶分离样品。半干式转膜,恒流 400 mA,120 min时长将蛋白转至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,将膜置于一抗稀释液 (1∶500) 中,4 ℃ 过夜。第 2 d 磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline tablets with Tween- 20, PBST)清洗后,将膜置于二抗稀释液(1∶1 000)中,37 ℃孵育 2 h,PBST 再次清洗。将清洗后硝酸纤维素膜在暗室进行显影,根据荧光亮度压片获得蛋白条带。采用 Quantity One 4.6.2 凝胶电泳图像分析系统对目的蛋白 NR-2A、NR-2B 和内参蛋白 β-tubulin 进行定量分析,计算目的蛋白与内参蛋白 β-tubulin 积分光密度(integrated optical density, IOD)比值。

1.4　*统计分析*　结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,最小显著差法做组间比较,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　*染铝后大鼠一般状况*　整个试验期间,对照组大鼠生长正常,活动能力正常。随着染铝剂量升高,大鼠表现出活动能力下降、精神萎靡、反应迟钝、饮食减少、毛色光泽欠佳,中、高剂量组大鼠表现尤为明显。

2.2　*大鼠海马组织病理学改变*(图 1)　对照组大鼠海马锥体细胞层排列整齐,神经元结构基本完整。低、中剂量组大鼠海马组织出现细胞数目减少、排列凌乱、胞浆深染等损伤表现,高剂量组大鼠海马锥体层细胞明显损伤,排列松散稀疏、分层不清,部分细胞可见胞浆浓染、胞核皱缩、空泡变性、坏死崩解等现象。

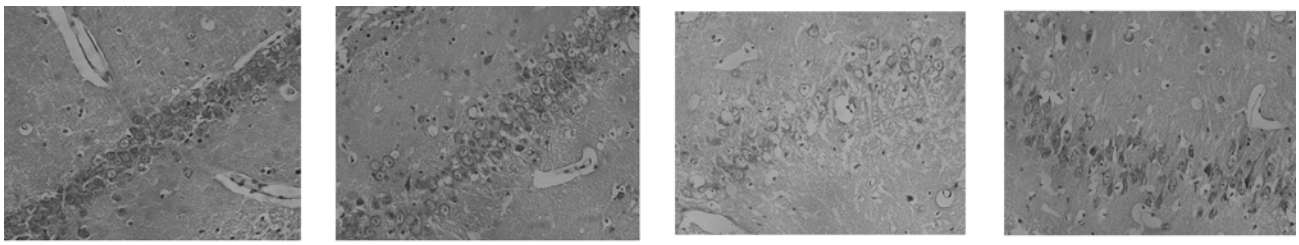


图 1　各组大鼠海马组织病理学改变(HE 染色, ×400)

2.3　Al(mal)$_3$ *对大鼠学习记忆能力影响*(表 1)　在定位导航试验中,随着染铝剂量增加,大鼠找到平台时间逐渐延长;与对照组比较,中、高剂量组大鼠找到平台时间均明显延长(t = 52.69、11.08, P < 0.01);与低剂量组比较,高剂量组大鼠找到平台时间也明显延长(t = 2.96, P < 0.05)。在空间探

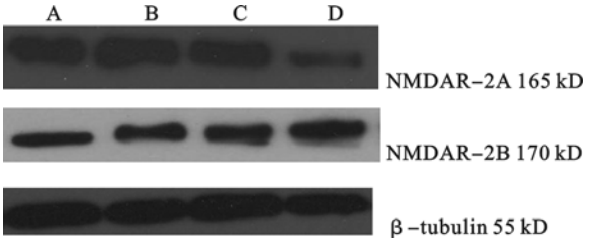
索试验中,与对照组比较,中、高剂量组大鼠目标象限停留时间均明显减少($t = 7.09$、7.88, $P < 0.01$);与对照组和低剂量组比较,高剂量组大鼠穿越平台次数均明显减少($t = 6.89$、24.23, $P < 0.05$)。

表 1　$Al(mal)_3$ 对大鼠学习记忆能力影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别(mg/kg)		找到平台时间(s)	目标象限停留时间(s)	穿越平台次数(次)
对照组		26.80 ± 1.59	50.78 ± 13.06	4.00 ± 2.16
麦芽酚铝	0.41	35.89 ± 2.92	46.81 ± 2.51	3.42 ± 0.82
	0.81	44.12 ± 5.62[a]	33.98 ± 8.26[a]	2.28 ± 0.81
	1.23	45.92 ± 13.97[ab]	33.76 ± 7.06[a]	1.67 ± 0.30[ab]
F 值		7.73	6.25	4.44
P 值		0.001	0.004	0.015

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与低剂量组比较,b $P < 0.05$。

2.4　$Al(mal)_3$ 对大鼠海马 NMDAR 影响(图 2)　结果表明,对照组、低、中、高剂量染铝组 NR-2A 蛋白表达分别为(0.69 ± 0.03)、(0.61 ± 0.11)、(0.44 ± 0.12)、(0.32 ± 0.19);与对照组比较,中、高剂量组均明显降低,差异均有统计学意义($t = 15.63$、11.34, $P < 0.05$);与低剂量组比较,高剂量组也明显下降($t = 7.27$, $P < 0.01$)。对照组、低、中、高剂量染铝组 NR-2B 蛋白水平分别为(0.58 ± 0.14)、(0.62 ± 0.44)、(0.98 ± 0.37)、(1.43 ± 1.09),组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A:对照组;B、C、D:低、中、高剂量 $Al(mal)_3$ 组。

图 2　$Al(mal)_3$ 对大鼠海马 NMDAR-2A、NMDAR-2B 亚基蛋白表达影响

3　讨　论

近年来研究显示,铝是一种慢性蓄积性神经毒物,易沉积于脑内对中枢神经系统产生毒性作用,导致记忆、注意力下降等神经功能改变[5]。小鼠腹腔注射 $AlCl_3$ 可致小鼠学习记忆运动障碍[6]。本研究结果也显示,随着 $Al(mal)_3$ 染毒剂量增加,大鼠找到平台时间明显延长,目标象限停留时间和穿越平台次数明显减少,表明 $Al(mal)_3$ 可对大鼠空间学习记忆能力产生明显损害作用。

NMDAR 是一种兴奋型氨基酸特异性受体,具有许多不同变构调控位点并对 Ca^{2+} 高度通透,与学习记忆等高级神经活动有关。NR2(包括 NR2A ~ NR2D)作为 NMDAR 的功能亚单位,在脑区存在数量和位置表达不同,成年大鼠海马区主要表达 NR-2A和 NR-2B。海马是脑内重要学习记忆部位,NR-2A 和 NR-2B 的比例可能会影响其发育及突触可塑性形成。研究发现,铝可致 NMDAR 各亚基含量下降,对海马空间记忆能力产生损害作用,阻断长时程增强的诱发[7]。本研究结果表明,亚慢性染铝可致大鼠 NMDAR 亚基 NR-2A 蛋白水平下降,这可能与铝对其产生的抑制作用有关。NR-2B 蛋白表达提高与前期实验结果一致[8],但与一些研究结果不同[9],这可能与学习记忆过程较为复杂,涉及多种神经递质、信号转导途径等共同作用有关。NMDAR 有许多作用位点,如谷氨酸、甘氨酸、Ca^{2+}、Zn^{2+} 等,当 $Al(mal)_3$ 进入大鼠海马区后可能作用于其中任何位点,使 NR-2B 亚单位磷酸化程度升高,导致 NMDAR 激活,产生过度兴奋性毒性作用,进而对学习记忆产生损害,但其具体机制还有待于进一步探讨。

参考文献

[1] Frisardi V, Solfrizzi V, Capurso C, et al. Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment[J]. J Alzheimers Dis, 2010, 20(1): 17 – 30.

[2] 罗教华,邱志群,舒为群,等. 砷对大鼠海马超微结构和 NMDAR 表达影响[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(12): 1483 – 1485.

[3] Noritsugu K, Hiroyuki Y, Jitsuya T, et al. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(12): 2022 – 2031.

[4] Langui D, Probst A, Anderton B, et al. Aluminium-induced tangles in cultured rat neurones. Enhanced effect of aluminium by addition of maltol [J]. Acta Neuropathol, 1990, 80 (6): 649 – 655.

[5] Shin RW, Kruck TP, Murayama H, et al. A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminum and iron associated with hyperphosphorylated tau of Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2003, 961(1): 1139 – 1146.

[6] 商亚珍,缪红. 黄芩茎叶总黄酮对铝中毒小鼠记忆障碍的作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 361 – 365.

[7] Lu L, Dempsey J, Shaham Y, et al. Differential long-term neuroadaptations of glutamate receptors in the basolateral and central amygdala after withdrawal from cocaine self-administration in rats[J]. J Neurochem, 2005, 94(1): 161 – 168.

[8] 郭卫力. 谷氨酸受体在铝致小鼠学习记忆损伤中的作用[D]. 太原:山西医科大学硕士论文, 2009.

[9] 黄春桃,刘苹,武慧欣,等. 1800MHz 电磁波暴露对大鼠海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体表达的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(1): 21 – 24.

收稿日期:2012-06-18　　(解学魁编辑　郑新校对)