

铝对 *APP/PS1* 双转基因小鼠认知能力及 mGluR1 表达的影响

教霞, 张勤丽, 吉秀亮, 牛侨*

摘要: [目的] 对子代 *APP/PS1* 双转基因小鼠进行基因鉴定, 研究铝对小鼠学习记忆及脑组织内代谢性谷氨酸受体-1(mGluR1)表达的影响。[方法] 用 PCR 扩增转入基因组 DNA 中的 *APP* 基因, 鉴定其基因型; 将鉴定出的子代小鼠随机分为 2 组, 即生理盐水组和 5 mg/kg 铝暴露组, 每组 8 只; 采用腹腔注射, 连续 2 个月, 采用 Morris 水迷宫试验检测小鼠学习记忆能力的改变; 用蛋白印迹法(Western blot)和实时荧光定量 PCR 法检测脑组织中 mGluR1 蛋白和基因的表达水平。[结果] 鉴定出 *APP/PS1* 双转基因小鼠; Morris 水迷宫实验结果显示, 染铝组小鼠找到平台的潜伏期较对照组显著增加($P < 0.01$); Western blot 结果显示染铝组 mGluR1 蛋白表达量高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 实时荧光定量 PCR 结果显示染铝组 *mGluR1* 基因表达量高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。[结论] 铝可致 *APP/PS1* 双转基因小鼠学习和记忆能力障碍, 且与 mGluR1 蛋白和基因的表达水平升高有关。

关键词: 铝; 学习记忆; 代谢性谷氨酸受体-1

The Effect of Aluminum Chloride on Cognitive Ability of *APP/PS1* Double Transgenic Mice and the Expression of mGluR1 JIAO Xia, ZHANG Qin-Li, JI Xiu-liang, NIU Qiao* (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). *Address correspondence to NIU Qiao; E-mail: niuqiao55@163.com

Abstract: [Objective] To identify the genotype of the *APP/PS1* double transgenic mice, and to investigate the effects of aluminum on spacial learning and memory and the expression of mGluR1 in *APP/PS1* double transgenic mice. [Methods] The *APP* gene was amplified by PCR (polymerase chain reaction) from the mice genome DNA. The *APP/PS1* double transgenic mice were divided into 2 groups at random, i.e. normal saline group and aluminum exposed group (5 mg/kg), with 8 mice in each group. $AlCl_3$ was given to the mice in exposed group by intraperitoneal injection each other day for two months. The learning and memory abilities of mice were tested by the morris water maze test. The expression of mGluR1 was detected by QRT-PCR and Western blot. [Results] The *APP/PS1* double transgenic mice were identified. The latent period of morris water maze test in the exposed group was significantly increased ($P < 0.01$) as compared with the control group. The Western-blot demonstrated that mGluR1 expression in protein level was increased after exposed to aluminum ($P < 0.01$). The QRT-PCR result showed that the expression of *mGluR1* mRNA also increased after exposed to aluminum ($P < 0.01$). [Conclusion] Aluminum exposure can cause obvious descend of learning and memory ability in the *APP/PS1* double transgenic mice. Aluminum is also related with the upwards regulation of mGluR1.

Key Words: aluminum; learning and memory; mGluR1

铝广泛地存在于自然界, 有实验研究表明长期职业接触铝, 可引起明显的认知和学习记忆障碍, 铝的神经毒性导致的神经细胞损害以神经退行性改变为突出特征。脑组织中铝的异常蓄积可与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 发生有关^[1]。

AD 是一种神经退行性疾病。随着分子遗传学研究的深入, 已发现与 AD 多种相关基因, 包括淀粉样前体蛋白 (APP)、早老素蛋白 1 (PS1) 和早老素蛋白-2 (PS2) 基因、载脂蛋白 (apo)

E4 的等位基因等。这些基因的发现, 为转基因动物模型的建立提供了先决条件。*APP/PS1* 双转基因模型鼠是近年来被公认的比较成功的转基因 AD 模型。目前国内采用此模型作为研究对象的还比较少, 尤其是 AD 模型鼠形态学改变与其行为学变化的关系还很少见报道。

代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor, mGluR) 属于 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 超家族中第 3 家族成员, 它在学习记忆损伤和 AD 发病中也扮演十分重要的角色。

本实验从中国医学科学院动物实验中心引进 *APP/PS1* 双转基因小鼠, 并成功地繁殖了子代幼鼠。本项目拟对子代 *APP/PS1* 双转基因小鼠进行基因鉴定, 并且研究铝对小鼠学习记忆及脑组织内代谢性谷氨酸受体-1 (mGluR1) 表达的影响, 从而进一步探讨铝中毒的行为学机制。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30671777); 高等学校博士学科点项目 (编号: 200801140002)

[作者简介] 教霞 (1983-), 女, 硕士生; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: jiaoxia1983@126.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 APP/PS1 双转基因小鼠的建立与鉴定

1.1.1 实验动物 中国医学科学院实验动物研究所提供的 APP/PS1 双转基因小鼠嵌合体种鼠,此双转基因小鼠品系名为 C57BL/6J-TgN(APP/PS1)ZLFILAS,表达人突变的 PS1 (DeltaE9)和嵌合体小鼠(人)APP(APP^{swe})基因。该双转基因小鼠繁殖所产生后代,分笼喂养于光照/黑暗为 12h/12h 的恒温环境,每笼 2 只,自由摄食和饮水。

1.1.2 基因鉴定 抽取后代小鼠尾血 30 μL,参照口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒(购自天根公司)所提供的方法提取基因组 DNA,根据北京赛百盛生物技术有限公司设计合成的引物序列,扩增 APP,上游 5'-GAC TGA CCA CTC GAC CAG GTT CTG-3',下游 5'-CTT GTA AGT TGG ATT CTC ATA TCC G-3'。其产物大小为 350 bp。阳性对照为内参基因(GAPDH),上游 5'-TGA ACG GGA AGC TAA CTG G-3',下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。其产物大小为 307 bp。反应总体系为 25 μL: 10 × buffer 2.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, dNTP 5 μL, MgCl₂ 1.5 μL, 引物各 0.5 μL, 基因组 DNA 5 μL, 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 60 s, 56 °C 60 s, 72 °C 60 s, 循环 35 次, 72 °C 10 min, 扩增完毕后即行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2 实验动物分组及染毒

2 月龄健康雄性 APP/PS1 双转基因小鼠 16 只,活动能力相近,随机分为 2 组:生理盐水组和染 Al³⁺ 5 mg/kg 组。Al 为 AlCl₃ 溶液,高压灭菌后通过腹腔注射染毒,60 d 内 0.2 mL/d,隔天注射。整个染毒期间,动物室以自然节律采光,温度 18~23 °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。笼具、水瓶等所有用具,均不使用含铝制品。实验操作在每天上午 8:30~11:00 时完成。

1.3 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 ± 2) °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。定位航行试验(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,即为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 60 s 内未找到平台,其潜伏期按 60 s 计算。空间搜索试验(spatial probe test):实验第 4 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,观察分析小鼠停留于目标象限的时间。

1.4 mGluR1 蛋白表达量的测定

将冷冻的脑组织加入细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl, pH=7.6 0.01 mol/L Tris/HCl, pH=8.0 1 mmol/L EDTA, 100 mg/L PMSF, 2 mg/L Leupeptin),冰上超声破碎细胞,于 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min,离心半径 5 cm,取上清,用 BCA 试剂盒进行总蛋白定量,调蛋白浓度一致,与等体积的 2 × 上样 buffer 混匀,沸水浴 10 min。根据浓度确定上样体积,每孔上样 25 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 37 °C 封闭 3 h;将膜置于一抗稀释液(1/7 000)中,4 °C 过夜,PBST 洗 4 次,15 min/次,将膜置于生物素化二抗稀释液(1/10 000)中,37 °C 孵育 2 h,PBST 洗 4 次,15 min/次;将膜置于辣根酶标记链亲和素稀释液(1/10 000)中,37 °C 孵育 2 h,PBST 洗 4 次,15 min/次;将清洗后的膜与化学发光(ECL)检测试剂(用量为 0.20 mL/cm²)共同孵育 1 min,曝光 1~10 min 不等,获得蛋白条带。采用捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对 Western blot 检测的样本 mGluR1 蛋白和 β-Actin 内参的结果进行定量分析,然后计算待测蛋白与 β-Actin 光密度(D)的比值,比较两组: D_{mGluR1}/D_{β-Actin} 值的大小。

1.5 检测 mGluR1 基因表达的检测

1.5.1 总 RNA 的提取及反转录 用 Trizol 法抽提组织中的 mRNA,具体步骤为:在冷冻的脑组织加入 Trizol 试剂,冰上超声破碎细胞(避免产生泡沫),于 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,加入 0.12 mL 氯仿,充分振荡 15 s 至乳白色。室温静置 3 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min。取上清,加入 300 μL 异丙醇,室温静置 10 min。12 000 r/min 4 °C 离心 10 min。弃上清,加入 600 μL 75% 乙醇,混匀,7 500 r/min 4 °C 离心 5 min,弃上清,室温开盖放置 30 min,加入 RNAase-free 无菌水 50 μL, 1:1000 稀释于 260 nm 及 280 nm 处测定其光密度值,计算 mRNA 的纯度及含量。计算公式为: mRNA 纯度 = D₂₆₀ / (D₂₆₀ - 本底), mRNA 含量(mg/L) = D₂₆₀ × 40 × 100。如 mRNA 纯度 > 1.8,则进一步进行反转录。总 RNA 5 μL 加入 OligodT 2 μL ddH₂O 水 5 μL, dNTP 2 μL 离心混匀,70 °C 5 min,迅速冰上冷却 2 min,加入 5 × 缓冲液 4 μL, RNasin 0.5 μL, DTT 1 μL, M-MLV 1 μL 离心混匀,反转录参数: 25 °C 10 min, 42 °C 50 min, 95 °C 5 min。

1.5.2 引物序列以及实时荧光定量 PCR 反应条件 小鼠 mGluR1 基因和 GAPDH 引物序列见表 1,实时荧光定量 PCR 反应体系见表 2。

表 1 小鼠 mGluR1 基因和 GAPDH 引物序列信息

Table 1 mGluR1 gene and reference gene primer sequence information of mice

基因 Gene	正义序列 Sense	反义序列 Anti-sense	产物大小(bp) Product size
GAPDH	5'-TGAACCGGAAGCTAACTGG-3'	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	307
mGluR1	5'-CTCCAGAGGTCAGGTCGTT-3'	5'-TGGCATAGATGGCGTTG-3'	228

表 2 PCR 反应体系组成成分

Table 2 PCR reaction system composition

试剂(Reagent)	20 μL 反应体系(20 μL reaction system, μL)
2.5 × realMaster Mix/20 × SYBR	
Solution	9
10 μmol/L Primer 1	0.5
10 μmol/L Primer 2	0.5
cDNA	3
RNase free water	至 20

mGluR1 基因检测条件: 94 °C 5 min, 94 °C 50 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min, 40 个循环, 然后 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s 收集荧光信号。

反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线, 基因的表达强度 CT 值、GADPH 标化后, 按 2^{-CT} 方法计算。

1.6 统计方法

全部数据用“均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)”表示, 所有数据用 SPSS 13.0 分析软件分析, 两组间比较用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 扩增 APP 基因

以基因组 DNA 为模板, 可见在所获得的 5 只小鼠中均扩增出 307 bp 大小条带阳性对照 GAPDH, 其中 3 只小鼠基因组 DNA 扩增出 350 bp 大小条带, 与预计所扩增 APP 基因大小一致(见图 1)。由于该小鼠在构建载体为大脑特异性的 PrP 启动子同时控制 *PSI* 和 *APP* 基因的表达, 所以扩增出 *APP* 可认可所获得后代中有 3 只成功转入 *APP* 和 *PSI* 基因。

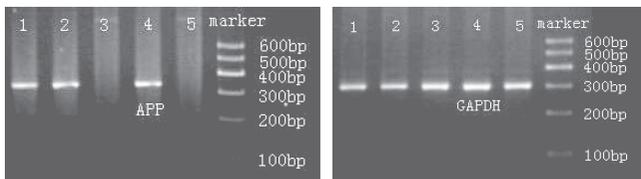


图 1 PCR 扩增 APP 基因结果

Figure 1 The expression of APP gene of APP/PSI double transgenic mice (n=5)

2.2 Morris 水迷宫试验

Morris 水迷宫检测的结果显示, *APP/PSI* 双转基因小鼠染铝组找到平台的潜伏期较对照组显著增加 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 $AlCl_3$ 所致 *APP/PSI* 双转基因小鼠神经行为学结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of $AlCl_3$ exposure on the abilities of learning and memory of APP/PSI double transgenic mice (Mean ± SD)

组别 (Group)	例数 (n)	平均逃逸潜伏期 (Average escape latency, s)	
		染铝前 (Before exposure)	染铝后 (After exposure)
生理盐水组 (Saline group)	8	25.14 ± 10.81	28.71 ± 4.33
染铝组 (Aluminum exposed group)	8	27.02 ± 5.45	49.21 ± 14.96*

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

2.3 mGluR1 蛋白的表达结果

Western blot 结果显示, 与生理盐水组相比, 染铝组 mGluR1 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$), 见表 4。图 2 为两组的 β -Actin 和 mGluR1 蛋白的电泳图, 从图中可以看出两组 β -Actin 蛋白的电泳条带粗细相近, 而铝接触组的 mGluR1 蛋白电泳条带明显粗于对照组。

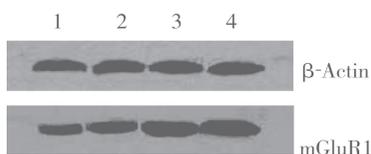


图 2 染铝后 mGluR1 蛋白表达情况

Figure 2 The expression of mGluR1 protein after $AlCl_3$ exposure

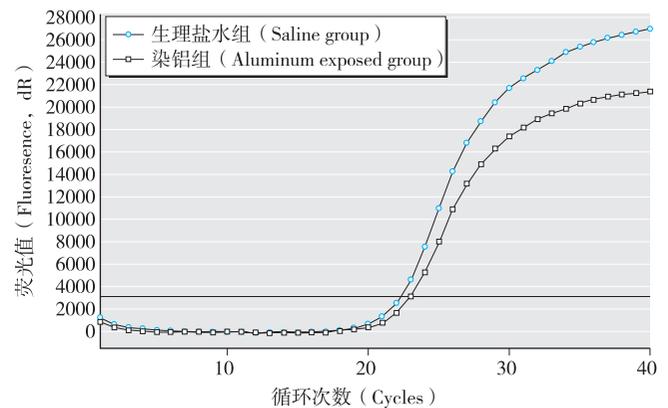
表 4 $AlCl_3$ 所致 *APP/PSI* 双转基因小鼠 mGluR1 蛋白的变化 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 The expression of mGluR1 protein after $AlCl_3$ exposure (Mean ± SD)

组别 (Group)	例数 (n)	mGluR1 蛋白
生理盐水组 (Saline group)	8	0.95 ± 0.11
染铝组 (Aluminum exposed group)	8	1.95 ± 0.42*

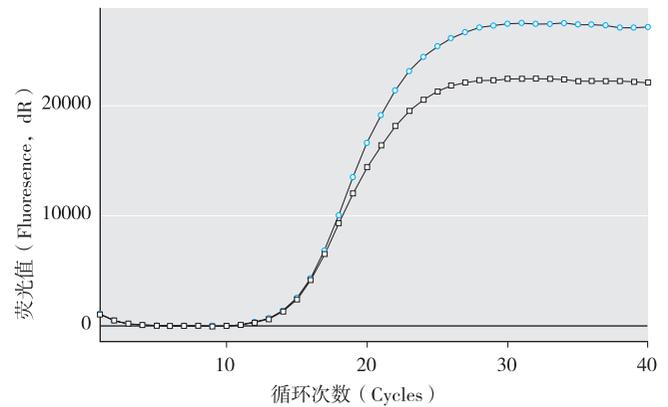
[注]*: 与对照组相比 (Compared with control group), $P < 0.01$ 。

2.4 mGluR1 基因的表达结果

图 3 为 *mGluR1* 基因和 *GAPDH* 基因的扩增曲线, 其中蓝色的代表对照组, 黑色为铝接触组, 从 *GAPDH* 扩增曲线可以看出两组的 CT 值相近, 而 *mGluR1* 基因的扩增曲线中, 铝接触组的 CT 值比对照组大; 通过统计学分析由表 5 可见, 与生理盐水组相比, 染铝组 mGluR1 mRNA 表达显著增高 ($P < 0.01$)。



mGluR1 基因 (mGluR1 gene)



GAPDH 基因 (GAPDH gene)

图 3 mGluR1 基因表达的扩增曲线

Figure 3 mGluR1 gene amplification plots

表 5 $AlCl_3$ 所致 *APP/PSI* 双转基因小鼠 mGluR1 基因的变化 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 The expression of mGluR1 gene after $AlCl_3$ exposure (Mean ± SD)

组别 (Group)	例数 (n)	mGluR1
生理盐水组 (Saline group)	8	0.21 ± 0.81
染铝组 (Aluminum exposed group)	8	0.42 ± 0.31*

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

3 讨论

目前, 全球正步入老龄化社会, 越来越多的老龄化问题受到关注。其中备受关注的就是神经系统的退行性变疾病, 如阿

尔茨海默病、帕金森综合征、肌萎缩侧索硬化症、亨廷森氏病,其中又以阿尔茨海默病最为常见。主要表现在中枢神经系统一定区域内因神经元损伤或死亡所导致的一系列改变^[2]而出现不同临床症状。迄今,引起这些退行性改变的原因尚未十分清楚。

铝是自然界含量丰富的金属元素之一。铝作为一种慢性神经毒性物质,长时间接触会对神经系统造成损害,并且可能与阿尔茨海默病等神经退行性病变有关。动物实验研究认为铝染毒导致记忆力的下降^[3],对猫、家兔、大鼠和小鼠等通过多种途径染铝,均可引起一系列行为异常,而且出现认知和记忆障碍的时间也早于其他指标。与其他年幼动物相比,铝的行为毒性多见于成年和老年动物,且年龄越大,对铝的行为毒性越敏感。本研究结果显示腹腔注射 $AlCl_3$ 可导致 *APP/PS1* 双转基因 AD 模型鼠空间学习和记忆能力的障碍。

国内有学者报道^[4]海马氨基酸类神经递质含量的改变可能是铝神经毒性的重要机制之一。谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统内的主要神经递质,约 50% 的谷氨酸参与调节中枢神经系统内的突触传递,几乎可调节正常脑内的所有功能,包括学习、记忆、运动、认知和发育,并与神经细胞的存活、突触的形成及可塑性密切相关。谷氨酸受体可分为离子型谷氨酸受体 (ionotropic glutamate receptors, iGluRs) 和代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs)。前者包括 NMDA、AMPA 及 KA 受体等离子通道结构,介导快速兴奋性突触传递;后者属 G 蛋白耦联受体家族,根据其氨基酸序列的同源性、信号转导机制和药理学特性的不同,将其分为三组: ~ 组 mGluRs。第一组 (mGluR) 包括 mGluR1、mGluR5; 第二组 (mGluR) 包括 mGluR2、mGluR3; 第三组 (mGluR) 包括 mGluR4、mGluR6、mGluR7、mGluR8。最近研究表明 mGluRs 与突触可塑性和神经细胞凋亡密切相关,可能在学习记忆损伤中扮演重要角色^[5-7]。型 mGluRs 主要是位于突触前,可通过促进磷酸肌醇 (PI) 水解引起细胞内钙释放增加从而导致神经损害^[8],其中 mGluR1 是一种十分重要的中枢神经系统兴奋性氨基酸受体,由 1199 个氨基酸残基构成的跨膜蛋白,其 N 末端和 C 末端都有相当数量亲水性的氨基酸残基,与相应的配体结合后主要产生兴奋作用。中间神经元上 mGluR1 介导的谷氨酸的兴奋作用是通过瞬时感受电位通道 3/7 (TrpC3/C7) 样的阳

子通道激活作用而产生的,而且 mGluR1 能降低动作电位幅度和快速瞬时钠电流,改变快速瞬时钠电流失活曲线和快速持续钠电流的激活曲线,调节神经元的兴奋性^[9]。mGluR1 与大脑的学习记忆有关,其参与了认知能力的改变。本研究结果显示染铝组 *APP/PS1* 双转基因小鼠脑内 mGluR1 的表达上调。提示 mGluR1 可能在铝对神经系统造成损害的过程中起重要作用。

本实验从铝引起 mGluRs 蛋白和基因表达的改变入手来探讨铝的神经毒性机制,对探索铝的神经毒性具有意义。

参考文献:

- [1] 刘成铮,陈光,徐格晟,等. Alzheimer 型老年性痴呆与铝的关系[J]. 临床神经病学杂志,1994,7(1): 37-38.
- [2] CAMPBELL A, BECARIA A, LAHIRI DK, et al. Chronic exposure to aluminum in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(4): 565-572.
- [3] 程灶火,王力. 老年痴呆、帕金森病和脑梗死患者的记忆损伤特征[J]. 中国行为医学科学,2005,14(7): 60-62.
- [4] 贾怡昌,钟才云,王颖明,等. 铝对大鼠海马氨基酸类神经递质含量的影响[J]. 中华预防医学杂志,2001,35(6): 397-400.
- [5] 牛侨,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): 45-47.
- [6] 牛丕业,牛侨,何淑嫦. 天麻对铝染毒大鼠大脑皮质氨基酸递质的影响[J]. 环境与职业医学,2004,21(1): 55-57.
- [7] WANGM, CHEN JT, RUAN DY, et al. The influence of developmental period of aluminum exposure on synaptic plasticity in the adult rat dentate gyrus in vivo[J]. Neuroscience, 2002, 113(2): 411-419.
- [8] NICOLETTI F, BRUNO V, COPANI A, et al. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(7): 267-271.
- [9] BERG AP, SEN N, BAYLISS DA. TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons[J]. J Neurosci, 2007, 27(33): 8845-8856.

(收稿日期: 2009-03-23)

(编辑: 徐新春; 校对: 丁瑾瑜)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志自 2010 年由双月刊变更为月刊

根据上海市新闻出版局“沪新出报[2009]327号”文件的批复,《环境与职业医学》杂志自 2010 年 1 月起,刊期由双月刊正式变更为月刊,出版日期为每月 25 日,邮发代号 4-568。定价仍为每册 10.00 元(含包装及平邮邮资;需挂号者另计费),欢迎订阅。希望业内广大读者、作者继续关注、支持《环境与职业医学》杂志。

《环境与职业医学》编辑部