

# 亚慢性铝暴露致小鼠脑神经细胞 DNA 损伤

杨永坚, 胡浩, 李小平, 王取南

(安徽医科大学公共卫生学院, 安徽 合肥 230032)

**摘要:** 目的 研究亚慢性铝暴露对小鼠脑神经细胞 DNA 损伤作用。方法 雄性 ICR 小鼠经饮水(双蒸水)中加入三氯化铝染毒, 4 组分别为低剂量组 [10 mg/ (kg·d)]、中剂量组 [50 mg/ (kg·d)]、高剂量组 [300 mg/ (kg·d)] 和对照组(饮双蒸水), 各组均正常供给食物, 饲养 100 d 后处死小鼠, 分别分离脑海马、皮质部位, 制成细胞悬液, 运用单细胞凝胶电泳技术 (SCGE 彗星实验) 观察 DNA 损伤程度。结果 4 组脑海马、皮质部位神经细胞彗星拖尾率差异显著 ( $\chi^2=385.07$ ,  $P<0.001$ )。进一步用 Ridit 分析, 染毒各组海马神经细胞核拖尾长度等级 Ridit 值与对照组相比差异显著 ( $P<0.001$ ), 且低剂量与中剂量组、中剂量与高剂量组相比存在差异, Ridit 值有随剂量增加而增大的趋势。各组皮质神经细胞除低剂量组与中剂量组差别不显著外, 其他结果均与海马细胞分析结果相似。结论 铝暴露可损伤脑神经细胞核 DNA。

**关键词:** 铝; DNA 损伤; 小鼠; 彗星试验

中图分类号: O612.3; R394.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)03-0150-03

## DNA damage in mouse brain cells induced by subchronic exposure to aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>)

YANG Yong-jian, HU Hao, LI Xiao-ping, WANG Qu-nan

(Department of Occupational and Environmental Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract Objective** To study the effect of subchronic exposure to aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) on nuclear DNA damage in mouse brain cells using single cell gel electrophoresis assay (SCGE) comet assay. **Method** Male ICR mice were treated by drinking doubly-distilled water containing AlCl<sub>3</sub> [10, 50 and 300 mg/ (kg·d), respectively] and with control mice drinking doubly-distilled water only for 100 days as well as normal fodders for all groups. Mice were sacrificed by cervical dislocation 100 days after treatment and their hippocampus and cerebral cortex were rapidly excised and homogenized, and DNA damage in their nerve cells was tested by SCGE comet assay. **Result** Significant difference was observed in DNA damage of the brain cells in the hippocampus and cerebral cortex between the four groups ( $\chi^2=385.07$ ,  $P<0.001$ ). Ridit analysis showed that there was significant difference in rank of DNA tail length in the hippocampus cells treated with varied doses of AlCl<sub>3</sub> as compared with that in control group ( $P<0.001$ ), as well as there were significant differences between the low-dose group and medium-dose group and between the medium-dose group and high-dose group, with an increasing tendency of Ridit value with dose, except for the Ridit value in the low-dose group as compared with that in medium-dose group. **Conclusion** Subchronic exposure to AlCl<sub>3</sub> in vivo could cause DNA damage in brain cells in mice.

**Key words:** Aluminum; DNA damage; Mice; Comet assay

铝是自然界中第三大元素, 日常生活中广泛接触。它的神经毒性屡见报道, 临床上能引起透析性脑病、骨软化病、非缺铁性小细胞性贫血, 并怀疑其与多种神经退行性疾病相关<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示职业性铝暴露工人存在学习记忆能力下降、反应速度减慢、手眼协调能力降低等影响<sup>[2]</sup>。铝的毒性机制仍未完全明确, 目前认为, 铝对神经系统的毒性作用是多方面的, 主要影响中枢神经递质、脂质过氧化、钙代谢及有关酶等。已知铝可促进铁蛋白释放三价铁, 而后者可启动 Fenton 反应, 导致氧化损伤<sup>[3]</sup>。Morris 等<sup>[4]</sup>彗星实验敏感地

检测出单个神经元 DNA 氧化损伤状况。为进一步研究铝对脑神经细胞 DNA 链的损伤, 本研究用单细胞凝胶电泳技术 (彗星实验, SCGE) 检测小鼠暴露不同浓度 AlCl<sub>3</sub> 100 d 对 DNA 损伤的情况, 对亚慢性铝染毒损伤 DNA 链的机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器及试剂

DYY-10 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂), Leica 荧光显微镜, AlCl<sub>3</sub> (分析纯) 购自上海试剂公司, 正常熔点琼脂糖 (NMA)、低熔点琼脂糖 (LMA)、肌氨酸钠、溴化乙锭 (EB) 及 TritonX-100 等均购自 Sigma 公司, 其他试剂均为分析纯。双蒸水由实验室自制, 小鼠饲料购自安徽医科大学实验动物中心。

### 1.2 动物及处理

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2005-03-04

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目 (2002kj162)

作者简介: 杨永坚 (1958-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事职业卫生及职业病的教学与科研工作。

清洁级 8 周龄雄性 ICR 小鼠 60 只购自北京维通利华试验动物公司, 在温度  $21 \sim 23^{\circ}\text{C}$  和湿度  $(55 \pm 5)\%$  的环境下每天循环 AM8:00 照明 12 h 和 PM8:00 黑暗 12 h, 适应性饲养 1 个月。成年小鼠 ( $> 90$  d) 体重达  $(33.1 \pm 1.3)\text{g}$  时, 随机分为 4 组, 每组 15 只, 每笼 5 只群养。对照组饮双蒸水,  $\text{AlCl}_3$  作为染毒物质, 溶于双蒸水中供小鼠自由饮用, 分别给予低剂量组  $10\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、中剂量组  $50\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、高剂量组  $300\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 按上周饮水量日均值估计下周日饮水量, 每周称重 1 次, 计算下周各组饮水染毒浓度, 根据饮水量多少投放相应的  $\text{AlCl}_3$  溶质, 以确保达到要求的染毒浓度。各组均正常供给食物, 饲养 100 d。

### 1.3 实验步骤

1.3.1 单细胞悬液的制备 小鼠禁食 12 h 后脊椎脱臼处死取脑, 用预冷的 PBS 冲洗, 去浮血, 取右侧海马和额叶皮质分别放于 7 ml EP 管中, 加入 2 ml 的  $0.125\%$  胰蛋白酶  $37^{\circ}\text{C}$  消化 20 min, 以  $1\ 000\text{ r}/\text{min}$  离心 5 min, 去除消化液,  $10\%$  小牛血清 + DMEM 细胞培养基 2 ml 终止消化, 用  $\text{pH}=7.4$  的  $0.01\text{ mol}/\text{L}$  PBS 洗 3 次, 通过 200 目不锈钢筛, 1 ml PBS 垂悬细胞,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。从对照组随机取 8 份样本抽取 0.5 ml 处理好的细胞悬液, 铺胶前 1 h 加入终浓度  $1\text{ mmol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  为阳性对照组。

1.3.2 制胶片 第 1 层凝胶的制备: 取磨砂载物片, 将预热  $45^{\circ}\text{C}$  的  $100\ \mu\text{l}$   $0.6\%$  NMA 的 PBS 滴在载物片上, 迅速盖上干净的盖玻片,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱冷却 10 min 使 NMA 凝固。第 2 层凝胶的制备: 将所制取的单细胞悬液与  $37^{\circ}\text{C}$  的 LMA 以 1:5 比例混合均匀, 轻轻揭去第 1 层胶上的盖玻片, 迅速将  $75\ \mu\text{l}$  含细胞的 LMA 滴在第 1 层琼脂糖上, 再立即盖上盖玻片,  $4^{\circ}\text{C}$  冷凝 10 min。第 3 层凝胶的制备: 第 2 层胶凝固后, 移去盖玻片, 再滴加预热  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $85\ \mu\text{l}$  含  $0.6\%$  LMA 的无钙镁 PBS, 之后盖上盖玻片。

1.3.3 细胞裂解 第 3 层胶凝固后移去盖玻片, 将其浸于新鲜配制、 $4^{\circ}\text{C}$  预冷的细胞裂解液 ( $\text{pH}=10$ ,  $2.5\text{ mol}/\text{L}$  NaCl、 $100\text{ mmol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 、 $10\text{ mmol}/\text{L}$  Tris、

质量分数  $1\%$  的肌氨酸钠, 临用前加质量分数  $10\%$  的二甲基亚砜、质量分数  $1\%$  的 Triton-100) 中裂解 1 h。

1.3.4 DNA 碱解旋 将载物片取出, 平行放置于盛有新鲜配制的电泳液 ( $\text{pH}=13$ 、 $1\text{ mmol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 、 $300\text{ mmol}/\text{L}$  NaOH) 的电泳槽中, 电泳液覆过玻片胶面  $0.2 \sim 0.3\text{ cm}$ , 放置 20 min, 使 DNA 双链充分松解。

1.3.5 电泳与中和 调节电泳仪使电压保持  $0.8\text{ V}/\text{cm}$ , 电流稳定  $80\text{ mA}$ , 电泳 20 min。取出载物片, 缓缓加入 Tris-HCl ( $\text{pH}=7.5$ ) 缓冲液中, 将载物片淹没 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

1.3.6 染色与观察 在胶面上滴 2~3 滴 EB ( $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 盲法读片, 荧光显微镜下 ( $\times 400$  倍) 每张玻片随机观察 3~4 个视野 25 个细胞左右, 显微镜自带数码相机拍照并记数彗星细胞百分数和根据分级标准分级记数。根据彗星尾部/头部长度百分比将 DNA 损伤程度分 4 级: 0 级 (无损伤)  $< 5\%$ , 1 级 (轻度损伤)  $5\% \sim 50\%$ , 2 级 (中度损伤)  $50\% \sim 100\%$ , 3 级 (重度损伤)  $> 100\%^{19}$ 。

### 1.4 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件分析处理各组数据,  $\chi^2$  检验分析各组拖尾率, Ridit 法分析各组尾长分级差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况

经 100 d 饮水染毒, 对照组 1 只小鼠 60 d 时意外死亡, 其他各组均无死亡现象, 4 组小鼠一般情况良好, 毛色光洁度、活力、步态、分泌物、眼外观、呼吸、神态等均无明显差异。处死时 4 组间体重、脑湿重、脑湿重/体重分别进行多变量方差分析, 差异无显著性 ( $F_{3,59}=1.21$ ,  $P>0.05$ )。

### 2.2 各组彗星拖尾率

分析摄入不同浓度的铝对小鼠脑细胞 DNA 损伤比率的变化, 经  $\chi^2$  检验, 4 组脑海马部位细胞彗星拖尾率  $\chi^2=385.07$  ( $P<0.001$ ), 脑皮质部位细胞彗星拖尾率  $\chi^2=333.5$  ( $P<0.001$ ), 见表 1。

表 1 小鼠脑海马、皮质部位神经细胞彗星拖尾率比较

组别	鼠数	海马				皮质			
		观察细胞数	正常数	异常数	异常率 (%)	观察细胞数	正常数	异常数	异常率 (%)
对照组	14	413	364	49	11.9	338	292	46	13.6
低剂量组	15	431	197	234	54.3	350	200	150	42.9
中剂量组	15	465	210	255	55.0	366	270	96	26.2
高剂量组	15	688	189	499	72.5	408	102	306	75.0
阳性对照	8	200	0	200	100.0	196	0	196	100.0

### 2.3 各组细胞彗星拖尾长度等级 Ridit 分析

按照分级标准得出各组不同级别细胞数, 多组海

马细胞彗星拖尾等级 Ridit 值比较, 各组显著不同 ( $\chi^2=156.78, P<0.001$ ), 由表 2 可见低剂量、中剂量和高剂量组 Ridit 值有增高的趋势, 等级存在剂量-反应关系。染毒各组与对照组 Ridit 值两两比较等级分布差别有显著性 ( $P<0.001$ )。

表 2 各组海马神经细胞彗星拖尾长度分级及 Ridit 分析结果

组别	鼠数	观察细胞数	0 级	1 级	2 级	3 级	Ridit 值	95%CI	
								下限	上限
对照组	14	413	364	13	4	32	0.347 2	0.310 5	0.383 9
低剂量组	15	431	197	83	53	98	0.423 3 *	0.400 1	0.446 4
中剂量组	15	465	210	119	45	91	0.490 4 *	0.463 8	0.517 0
高剂量组	15	688	189	85	78	336	0.541 2 *	0.516 4	0.566 1

\* 与对照组相比  $P<0.001$ , 表 3 同。

皮质神经细胞彗星拖尾等级数经 Ridit 检验分析, 各组等级分布显著不同 ( $\chi^2=272.71, P<0.001$ ), 除中剂量组 Ridit 值较低剂量组小外, 其他与海马细胞分析结果相同, Ridit 值有增高的趋势。经 Ridit 值两两比较, 低、中、高剂量组与对照组相比等级分布差异均有显著性 ( $P<0.001$ ), 低剂量组与中剂量组差别不显著 ( $P>0.05$ )。见表 3。

表 3 各组皮质神经细胞彗星拖尾长度分级及 Ridit 分析结果

组别	鼠数	观察细胞数	0 级	1 级	2 级	3 级	Ridit 值	95%CI	
								下限	上限
对照组	14	338	292	30	15	1	0.309 1	0.278 3	0.339 9
低剂量组	15	350	200	40	30	80	0.469 9 *	0.439 6	0.500 1
中剂量组	15	366	270	20	10	66	0.397 6 *	0.368 0	0.427 1
高剂量组	15	408	102	90	54	162	0.624 3 *	0.596 3	0.652 3

### 3 讨论

经多次预实验本研究得出结论, 脑神经细胞彗星实验条件要求严格, 最终确定电压 0.8 V/cm、电流 80 mA、电泳时间 20 min 为最佳条件, 较其他类型细胞电泳条件电压低、电流小<sup>[7]</sup>, 可能是神经细胞相对脆弱之故。脑胶质细胞、神经元形态大小各异, 彗星实验中各类细胞即使受损程度相同, 因细胞核大小不同, 拖尾长度也可能不同。为了解决该问题, 根据彗星尾部占头部长度百分比分等级的办法判断神经细胞 DNA 受损程度, 较为理想。

Meriga 等<sup>[8]</sup>把水稻暴露于 80 mol/L Al<sup>3+</sup> 水中栽培, 结果随时间的延长幼苗 ROS 活性增强, MDA 含量增高, 引起幼苗细胞 DNA 损伤。傅洪军等<sup>[9]</sup>将大鼠皮质培养 7 d 染铝 48 h, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果各染铝组均出现 DNA ladder 这一典型的凋亡特征。国内外很少用彗星实验技术检测铝对神经细胞 DNA 损伤。本研究通过饮水中加入 AlCl<sub>3</sub> 染毒, 由胃肠道吸收与日常生活吸

收铝途径相同, 各组小鼠体重、脑重变化无差异。低、中、高剂量组海马神经细胞发生 DNA 断链产生彗星拖尾率组间有差别, 低剂量组海马神经细胞彗星拖尾发生率达 54.3%, 说明脑细胞对铝毒性作用敏感。进一步用 Ridit 分析各组等级分布状况, 高剂量组高级别最多, Ridit=0.541 2, 与对照组相比差异显著, 低剂量、中剂量组与对照组相比差异也存在显著性 ( $P<0.001$ ), 同样大脑皮质神经细胞彗星实验结果染铝各组 Ridit 值与对照组相比差异有显著性 ( $P<0.001$ ), 但低剂量和中剂量组相比无差异 ( $P>0.05$ ), 需进一步探讨。化学毒物在体内的代谢过程中能产生自由基, 其数量超过机体灭活能力范围时, 抗氧化系统酶功能失常, 从而破坏细胞膜, 使蛋白质变性, 细胞产生氧化损伤, 核酸的氧化损伤包括碱基损伤和 DNA 链断裂。大量实验已证明铝能透过血脑屏障造成铝离子浓度升高<sup>[10]</sup>, 铝通过铁介导启动 Fenton 反应产生自由基。所以铝产生氧化损伤可能是脑神经细胞核 DNA 损伤的主要原因。

### 参考文献:

- [1] Nayak P. Aluminum: impacts and disease [J]. Environ Res, 2002, 89: 101-115.
- [2] Akila R, Stollery BT, Riihimaki V. Decrements in cognitive performance in metal inert gas welders exposed to aluminum [J]. Occup Environ Med, 1999, 56: 632-639.
- [3] Zatta P, Kiss T, Suwalsky M, et al. Aluminum (III) as a promoter of cellular oxidation [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2002, 228: 271-284.
- [4] Morris EJ, Dreixler JC, Cheng KY, et al. Optimization of single-cell gel electrophoresis (SCGE) for quantitative analysis of neuronal DNA damage [J]. Biotechniques, 1999, 26: 282-289.
- [5] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell [J]. Exp Cell Res, 1988, 175: 184-191.
- [6] Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, et al. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay [J]. Mutat Res, 1994, 307: 261-271.
- [7] Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28: 529-536.
- [8] Meriga B, Reddy BK, Rao KR, et al. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice [J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 63-68.
- [9] 傅洪军, 董胜璋, 任铁玲等. 氯化铝对大鼠皮层神经细胞凋亡及 bcl-2、bax 基因表达的影响 [J]. 卫生毒理学, 2003, 17: 20-23.
- [10] Yokel RA, Allen DD, Ackley DC, et al. The distribution of aluminum into and out of the brain [J]. J Inorg Biochem, 1999, 76: 127-132.