

文章编号: 1000-8020(2015)03-0359-05

·论著·

## 铝致大鼠认知能力和全基因组 甲基化改变的研究

原宇宙 杨晓娟<sup>1</sup> 任佩 亢盼 李朝阳 牛侨<sup>2</sup>  
山西医科大学公共卫生学院,太原 030001



**摘要:** 目的 研究铝对大鼠认知能力及全基因组甲基化的影响。方法 健康清洁级 SD 雄性大鼠 72 只,按体重随机分成两部分 9 组,实验部分:对照组(生理盐水),低、中、高铝剂量组(0.27、0.54 和 1.08 mg/kg);干预部分:对照组(生理盐水),铝高剂量组(1.08 mg/kg),铝高剂量 + 叶酸低、中、高剂量组(0.7、1.5 和 3.4 mg/kg),每组 8 只。各组大鼠腹腔注射相应剂量麦芽酚铝(0.2 ml/d),同时叶酸各剂量干预组每日灌胃叶酸 1 ml/100 g 连续 60 d。采用 Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力,采用 ELISA 法测定大鼠全基因组甲基化。结果 Morris 水迷宫结果显示,铝暴露可导致大鼠目标象限停留时间明显缩短,穿越原平台位置的次数明显减少,铝低、中、高剂量组与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );叶酸干预铝高剂量组可导致大鼠目标象限停留时间明显延长和穿越原平台位置的次数明显增多,铝高剂量组与铝高 + 叶酸中、高剂量组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。大鼠全基因组甲基化测定结果显示:随铝染毒剂量的增加,0.54、1.08 mg/kg 染毒组大鼠全基因组甲基化率显著降低,与对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );而添加高剂量叶酸组全基因组甲基化率显著增加,与铝高剂量组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),与对照组比较差异无统计学意义。结论 铝可导致大鼠学习记忆能力下降,大鼠全基因组甲基化率降低,叶酸可能对其有改善作用。

关键词: 铝 大鼠 认知能力 全基因组甲基化

中图分类号: R994.6 Q593.2 R742

文献标志码: A

## Research of aluminum to the cognitive ability and genome-wide methylation in rats

YUAN Yuzhou ,YANG Xiaojuan ,REN Pei ,KANG Pan ,LI Zhaoyang ,NIU Qiao

Department of Occupational Health ,Shanxi Medical University ,Taiyuan 030001 ,China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of aluminum exposure on cognition ability and genome-wide methylation in rats. **Methods** Seventy-two healthy SD male rats were randomly assigned by weight into two parts and nine groups ( eight rats/group) . Exposure part included control group and low ,medium and high dose aluminum maltolate group ( 0.27 ,0.54 and 1.08 mg/kg aluminum maltolate) . Intervention part included control group ,1.08 mg/kg aluminum maltolate group ,1.08 mg/kg aluminum maltolate and low ,medium and high dose folic acid group ( 0.7 ,1.5 and 3.4 mg/kg folic acid) . Aluminum maltolate were subjected to peritoneal injection ( 0.2 ml/d) and folic acid were

基金项目: 国家自然科学基金( No. 81372968)

作者简介: 原宇宙,男,硕士研究生,研究方向: 化学物的神经毒性, E-mail: yyz\_0408@163.com

1 山西医科大学第一临床医学院老年病科

2 通信作者: 牛侨,男,博士,教授,研究方向: 化学物的神经毒性, E-mail: niuqiao55@163.com

subjected to intragastric administration in 1 ml/100 g for 60 days. The learning and memory abilities were examined by using Morris water maze test and genome-wide methylation was determined via ELISA assay. **Results** It was revealed by Morris water maze test that target quadrant residence time and through the original position were markedly shortened as a result of medium and high dose aluminum exposure when compared with control group (both  $P < 0.05$ ). The target quadrant residence time and through the original position were extended as a result of folic acid intervention when compared with 1.08 mg/kg aluminum maltolate exposure group. Both of them had statistical difference between 1.08 mg/kg aluminum maltolate and (1.5 mg/kg and 3.4 mg/kg) folic acid intervention group and 1.08 mg/kg aluminum maltolate exposure group (both  $P < 0.05$ ). Considerable decrease in genome-wide methylation rate was associated with elevated dosage of aluminum maltolate (0.54 mg/kg and 1.08 mg/kg) as compared with control group (both  $P < 0.05$ ). The genome-wide methylation rate was gradually increase as a result of high-dose folic acid intervention when compared with high-dose aluminum maltolate exposure group (both  $P < 0.05$ ). Both of them had no statistical difference when compared with control group (both  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Aluminum may induce learning and memory abilities and decrease genome-wide methylation rate in rats. Folic acid supplementation may improve its effect.

**Key words:** aluminum , rat , learning and memory ability , genome-wide methylation

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,临床表现为进行性记忆力减退、认知功能障碍以及人格改变等症状。铝是一种慢性神经毒性物质,是导致AD等神经退行性疾病的重要环境危险因素之一<sup>[1]</sup>。研究表明,铝能促进淀粉样蛋白的形成和聚集,从而在AD的致病过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>,慢性铝中毒可以使大鼠的空间分辨学习记忆能力和运动能力明显降低<sup>[3]</sup>,同时临床研究表明AD患者血浆同型半胱氨酸水平升高<sup>[4]</sup>,而叶酸对其具有拮抗作用<sup>[5]</sup>。MASTROENI等<sup>[6]</sup>研究表明表观遗传学修饰在AD有关学习和记忆过程中具有里程碑的意义。本课题组通过对大鼠进行亚慢性铝染毒同时加以叶酸干预,探讨铝致大鼠认知能力和全基因组甲基化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

结晶氯化铝(Sigma-Aldrich),麦芽酚(Sigma-Aldrich),叶酸(Sigma-Aldrich),UniversalGen DNA Kit通用型柱式基因组提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司),Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit全基因组DNA甲基化超量化工具盒(Epigentek Group Inc.),DMS-2型Morris水迷宫(北京中国医科院药研所),Nefuge 15R高速冷冻离心机(上海力申科学

仪器有限公司),SpectraMax M2型多功能酶联免疫检测仪(美国Molecular Devices公司)。

### 1.2 动物分组及染毒

健康雄性SD大鼠72只,体质量200~220g,由山西医科大学实验动物中心提供[合格证号SCXK(晋)2009-0001]。大鼠自由饮水、进食,并避免与铝制品接触,自然昼夜节律光照。将72只SD大鼠按体质量随机分成两部分9组:实验部分:对照组(生理盐水),低、中、高铝剂量组(0.27、0.54和1.08 mg/kg);干预部分:对照组(生理盐水),铝高剂量组(1.08 mg/kg),铝高剂量+叶酸低、中、高剂量组(0.7、1.5和3.4 mg/kg),每组8只。各染毒组大鼠腹腔注射相应剂量麦芽酚铝,每天0.2 ml/只,连续60 d,对照组大鼠每日腹腔注射相应体积0.9%氯化钠注射液,叶酸各剂量干预组每日灌胃叶酸1 ml/100 g。每周定时称量大鼠体重,调整染毒浓度。麦芽酚铝溶液和叶酸溶液按文献[7]、[8]方法配制。

### 1.3 神经行为学测试

染毒结束后,采用Morris水迷宫测定大鼠空间学习记忆能力。Morris水迷宫测试程序包括定位航行试验和空间探索试验两部分。①定位航行试验:从动物染毒结束开始,每天4次,每次2 min,间隔20 min,持续5 d。记录大鼠分别从4个不同象限入水点入水到找到平台所需的时间,即逃避潜伏期,4次逃避潜伏期成绩的平均值作

为当日最终成绩进行最后统计。若至 120 s 找不到平台,即将其引上平台,并使其在平台上停留 15 s,其潜伏期按 120 s 计算。②空间探索试验:第 5 天下午进行空间探索试验,撤去平台,将受试大鼠从任一入水点面向池壁放入水中,记录 60 s 内大鼠目标象限停留时间和穿越原平台位置的次数为观察指标,其平均值作为当日最终成绩进行最后统计<sup>[9]</sup>。

1.4 大鼠 DNA 的提取以及浓度和纯度的测定

Morris 水迷宫实验结束后,20% 乌拉坦麻醉大鼠,断头取脑,准确称取大鼠海马组织 20 mg 置于 1.5 ml EP 管中,采用 UniversalGen DNA Kit 通用型柱式基因组提取试剂盒提取大鼠 DNA。取待测 DNA 2 μl 按一定比例稀释,酶标仪测定 260 nm 和 280 nm 处吸光度值,计算得到 DNA 纯度和浓度。

1.5 大鼠全基因组甲基化测定

将 DNA 稀释至 150 ng/μl,采用 Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit 全基因组 DNA 甲基化超微量化工具盒测定大鼠全基因组甲基化率。

1.6 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 统计软件包进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,以  $P < 0.05$  作为差异有统计学意义标准。

2 结果

2.1 实验部分

2.1.1 定位航行实验结果 由表 1 可见,各组大鼠的逃避潜伏期随训练时间的延长而缩短。在同一天中,各染毒组大鼠的逃避潜伏期较对照组延长,但差异无统计学意义。

表 1 实验部分各组大鼠定位航行逃避潜伏期结果

组别	铅/( mg/kg)	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
对照组	0	65.67 ± 18.94	27.08 ± 5.99	11.82 ± 5.28	14.90 ± 8.46	12.32 ± 5.39
铅低剂量组	0.27	73.44 ± 24.35	32.91 ± 15.62	26.56 ± 18.34	16.55 ± 6.60	13.14 ± 6.50
铅中剂量组	0.54	80.69 ± 14.47	38.38 ± 17.80	26.24 ± 15.14	16.75 ± 7.11	14.36 ± 4.92
铅高剂量组	1.08	82.41 ± 17.77	43.71 ± 14.84	26.27 ± 19.42	21.69 ± 18.49	15.49 ± 11.24
F		1.27	2.00	1.74	0.54	0.28
P		0.30	0.14	0.18	0.66	0.84

2.1.2 空间探索实验结果 由表 2 可见,与对照组相比,铅低、中、高剂量组大鼠的目标象限停留时间逐渐缩短,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比,铅中、高剂量组大鼠穿越平台位置次数逐渐减少,且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),铅低剂量组穿越平台位置次数虽也减少,但差异无统计学意义。

表 2 实验部分各组大鼠空间探索结果

组别	铅/( mg/kg)	目标象限停留时间/s	穿越平台位置次数
对照组	0	34.95 ± 11.16	4.00 ± 1.31
铅低剂量组	0.27	21.43 ± 7.46 <sup>(1)</sup>	3.38 ± 1.51
铅中剂量组	0.54	14.32 ± 6.03 <sup>(1)</sup>	2.25 ± 1.58 <sup>(1)</sup>
铅高剂量组	1.08	15.22 ± 5.43 <sup>(1)</sup>	1.50 ± 0.93 <sup>(1)</sup>
F		10.63	6.19
P		0.00	0.00

注: (1) 与对照组比较  $P < 0.05$

2.1.3 全基因组甲基化测定结果 由表 3 可

见,随铅染毒剂量的增加大鼠全基因组甲基化率降低,与对照组相比,铅中、高剂量组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),铅低剂量组差异无统计学意义。

表 3 实验部分各组大鼠的全基因组甲基化结果

组别	铅/( mg/kg)	甲基化率/%
对照组	0	0.012942 ± 0.001275
铅低剂量组	0.27	0.011773 ± 0.004654
铅中剂量组	0.54	0.008446 ± 0.001559 <sup>(1)</sup>
铅高剂量组	1.08	0.005072 ± 0.001333 <sup>(1)</sup>
F		14.64
P		0.00

注: (1) 与对照组比较  $P < 0.05$

2.2 干预部分

2.2.1 定位航行实验结果 由表 4 可见,各组大鼠的逃避潜伏期随训练时间的延长而缩短。在同一天中,各叶酸干预组大鼠的逃避潜伏期均较铅高剂量组缩短,但差异无统计学意义。

表 4 干预部分各组大鼠定位航行逃避潜伏期结果

组别	铝 + 叶酸/(mg/kg)	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
对照组	0 + 0	74.57 ± 24.31	23.24 ± 7.95	22.10 ± 11.59	17.97 ± 21.72	16.88 ± 11.78
高铝组	1.08 + 0	96.86 ± 13.11	48.66 ± 40.24	33.45 ± 19.94	33.38 ± 14.38	24.38 ± 15.87
高铝 + 低叶酸组	1.08 + 0.7	89.53 ± 21.21	45.34 ± 24.89	32.28 ± 17.98	31.15 ± 17.75	22.88 ± 12.77
高铝 + 中叶酸组	1.08 + 1.5	79.74 ± 19.35	42.18 ± 21.95	26.00 ± 17.95	26.95 ± 10.45	18.50 ± 13.78
高铝 + 高叶酸组	1.08 + 3.4	79.21 ± 19.50	32.42 ± 6.90	23.53 ± 6.30	21.59 ± 7.67	15.56 ± 6.93
F		1.87	1.53	0.76	1.43	0.74
P		0.14	0.22	0.56	0.25	0.57

2.2.2 空间探索实验结果 由表 5 可见,与对照组相比,高铝组和高铝 + 低、中剂量叶酸组大鼠的目标象限停留时间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而高铝 + 高叶酸组目标象限停留时间差异无统计学意义。高铝组和高铝 + 低叶酸组大鼠的穿越平台位置次数与对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而高铝 + 中、高剂量叶酸组大鼠穿越平台位置次数差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与高铝组相比,高铝 + 中、高剂量叶酸组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而高铝 + 低剂量叶酸组大鼠穿越平台位置次数差异无统计学意义。

表 5 干预部分各组大鼠的空间探索结果

组别	铝 + 叶酸/(mg/kg)	目标象限停留时间/s	穿越平台位置次数
对照组	0 + 0	34.95 ± 11.17 <sup>(2)</sup>	3.25 ± 0.87 <sup>(2)</sup>
高铝组	1.08 + 0	13.84 ± 3.94 <sup>(1)</sup>	1.50 ± 0.54 <sup>(1)</sup>
高铝 + 低叶酸组	1.08 + 0.7	16.42 ± 6.04 <sup>(1)</sup>	2.13 ± 1.00 <sup>(1)</sup>
高铝 + 中叶酸组	1.08 + 1.5	21.43 ± 5.85 <sup>(1,2)</sup>	2.63 ± 0.74 <sup>(2)</sup>
高铝 + 高叶酸组	1.08 + 3.4	30.59 ± 6.87 <sup>(2)</sup>	3.13 ± 0.84 <sup>(2)</sup>
F		12.75	6.38
P		0.00	0.00

注:(1)与对照组比较, $P < 0.05$ ;(2)与高铝组比较, $P < 0.05$

2.2.3 全基因组甲基化测定结果 由表 6 可见,与对照组相比,高铝组、高铝 + 低、中剂量叶酸组大鼠的全基因组甲基化率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而高铝 + 高剂量叶酸组甲基化率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与高铝组相比,高铝 + 中、高剂量叶酸组全基因组甲基化率明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而高铝 + 低剂量叶酸组全基因组甲基化率有增加的趋势,但差异无统计学意义。

### 3 讨论

本研究发现亚慢性腹腔注射麦芽酚铝染毒可

表 6 干预部分各组大鼠的全基因组甲基化结果

组别	铝 + 叶酸/(mg/kg)	甲基化率
对照组	0 + 0	0.014384 ± 0.002573 <sup>(2)</sup>
高铝组	1.08 + 0	0.006590 ± 0.003451 <sup>(1)</sup>
高铝 + 低叶酸组	1.08 + 0.7	0.007132 ± 0.003050 <sup>(1)</sup>
高铝 + 中叶酸组	1.08 + 1.5	0.009489 ± 0.002509 <sup>(1,2)</sup>
高铝 + 高叶酸组	1.08 + 3.4	0.014379 ± 0.001620 <sup>(2)</sup>
F		14.87
P		0.00

注:(1)与对照组比较, $P < 0.05$ ;(2)与高铝组比较, $P < 0.05$

导致大鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越平台次数明显减少和目标象限停留时间明显缩短,表明亚慢性麦芽酚铝暴露能使大鼠空间学习记忆能力下降,与以往研究结果一致<sup>[10]</sup>,空间学习记忆能力下降是 AD 病人早期的临床表现。本研究同时发现,随着染毒剂量的增大,大鼠的全基因组甲基化率明显降低。DNA 甲基化是指 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)脱去 1 个甲基转变为 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),同时将该甲基转运至胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸中的胞嘧啶第 5 位碳原子(C)上,从而发挥调控基因转录作用<sup>[11]</sup>。机体从食物中获取叶酸,叶酸吸收后直接参与了 DNA 甲基化中甲基基团的转运,转化为其活性形式四氢叶酸,后者结合一碳单位后形成亚甲基四氢叶酸,从而参与 DNA 的合成。本研究结果显示,添加叶酸干预后,较高剂量染铝大鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越平台次数明显增加,目标象限停留时间明显延长。由于染毒和干预同时进行,说明叶酸在染毒过程中能拮抗铝的损害作用,保护大鼠的空间学习记忆能力。实验结果还表明,随着补充叶酸剂量的增加,大鼠的全基因组甲基化率明显升高,说明叶酸通过提高全基因组甲基化率来改善铝的毒性作用。

表观遗传学调控包括 DNA 启动子甲基化、组蛋白修饰(如乙酰化、甲基化、磷酸化等)、染色质

重塑以及 miRNA 负调控等,决定基因是否沉默或激活,并最终反映细胞、器官和机体的表型。有研究表明叶酸缺乏导致 DNA 甲基化的模式改变,主要与 S-腺苷甲硫氨酸有关。叶酸介导的一碳单位代谢通过 S-腺苷甲硫氨酸与表观遗传学相连<sup>[12]</sup>。可能是叶酸在大鼠体内作为“一碳单位”,参与 DNA 启动子区域甲基化过程,降低了“亚慢性铝可以使大鼠全基因组甲基化率降低”的作用,使亚慢性铝暴露大鼠全基因组甲基化率增加,从而影响大鼠的认知能力,其机制有待进一步研究。

本研究结果显示,随着铝染毒剂量的增加,大鼠的全基因组甲基化率明显降低,大鼠的空间学习记忆能力明显下降,添加叶酸干预后全基因组甲基化率明显升高,但大鼠的空间学习记忆能力与对照组无明显差异,其确切机制有待进一步研究。

参考文献

[ 1 ] KAWAHARA M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases [J]. J Alzheimers Dis , 2005 , 8 ( 2 ) : 171-182.

[ 2 ] 宋承远,郭纪锋,唐北沙. 表观遗传学在中枢神经系统退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志 , 2013 , 13( 7 ) : 555-559.

[ 3 ] 高丽萍,程书珍,王晓梅,等. 铝对大鼠学习记忆及海马神经细胞凋亡影响 [J]. 中国公共卫生 , 2009 , 25( 2 ) : 214-215.

[ 4 ] PACHECO-QUINTO J , DE TURCO R E B , DEROSA S , et al. Hyperhomocysteinemic Alzheimer'

s mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid peptide levels [J]. Neurobiol Dis , 2006 , 22: 651-665.

[ 5 ] 王健,张永泽,康美玉,等. 同型半胱氨酸对大鼠学习记忆及海马 APP 代谢影响 [J]. 中国公共卫生 , 2012 28( 7 ) : 948-950.

[ 6 ] MASTROENI D , GROVER A , DELVAUX E , et al. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging , 2011( 32 ) : 1161-1180.

[ 7 ] 肖淑萍,吉中国,马英文. 叶酸对阿尔茨海默病模型大鼠的影响 [J]. 实用预防医学 , 2005 , 12( 5 ) : 1019-1022.

[ 8 ] WU M N , ZHOU L W , WANG Z J , et al. Colivelin ameliorates amyloid  $\beta$  peptide-induced impairments in spatial memory , synaptic plasticity and calcium homeostasis in rats [J]. Hippocampus , 2015 , 25 ( 3 ) : 363-372.

[ 9 ] NATACHA C , MIKE D. Epigenetics in Alzheimer's disease: a focus on DNA modifications [J]. Current Pharmaceutical Design , 2011 , 17( 31 ) : 3398-3412.

[ 10 ] BOLLATI V , GALIMBERTI D , PERGOLI L , et al. DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease [J]. Brain Behavior Immun 2011 , 25( 6 ) : 1078-1083.

[ 11 ] SETHI P , JYOTI A , SINGH R , et al. Aluminium-in the hippocampus of aging rats [J]. Neurotoxicology , 2008 29( 6 ) : 1069-1079.

[ 12 ] 薛琴,马聪. 叶酸缺乏导致大鼠高同型半胱氨酸血症与行为学改变 [D]. 广州: 南方医科大学 , 2010: 6-10.

收稿日期: 2014-11-04

《卫生研究》编辑委员会

(按汉语拼音序)

- |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 名誉主任 | 葛可佑 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 主任   | 陈君石 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 委员   | 白雪涛 | 蔡琳  | 曹佳  | 曹兆进 | 常元勋 | 陈炳卿 | 陈君石 | 陈西平 | 陈学敏 | 程锦泉 | 程义勇 |  |
|      | 段国兴 | 郭红卫 | 郭新彪 | 韩驰  | 郝卫东 | 胡东生 | 季成叶 | 金水高 | 金泰虞 | 金银龙 | 兰亚佳 |  |
|      | 李德鸿 | 李洪源 | 李立明 | 李涛  | 李勇  | 李凤琴 | 梁超轲 | 林少彬 | 凌文华 | 刘秉慈 | 刘殿武 |  |
|      | 刘沛  | 刘小立 | 刘秀梅 | 马爱国 | 马冠生 | 牛侨  | 戚其平 | 秦立强 | 宋伟民 | 孙长颢 | 孙秀发 |  |
|      | 孙贵范 | 王五一 | 王心如 | 王振刚 | 王竹天 | 邬堂春 | 吴逸明 | 吴永宁 | 徐东群 | 徐贵发 | 徐海滨 |  |
|      | 薛彬  | 严卫星 | 杨克敌 | 杨晓光 | 杨月欣 | 叶冬青 | 荫士安 | 于雅琴 | 翟成凯 | 翟凤英 | 张朝武 |  |
|      | 张德兴 | 张国雄 | 张立实 | 张天宝 | 张祥宏 | 赵景波 | 张万起 | 张遵真 | 郑玉新 | 庄志雄 |     |  |