

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0034-05

六价铬对大鼠学习记忆的影响

黄国兴¹, 高琳¹, 赵丹婷², 杨文强², 柳晓琳¹, 杨菁²

(锦州医科大学 1. 公共卫生学院, 2. 辽宁省心脑血管药物基础研究重点实验室,
辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 观察六价铬 [Cr(VI)] 对大鼠学习记忆的影响。**方法** 母鼠哺乳期分别给予双蒸水 (对照组)、低 (0.8 mg/kg)、中 (4.0 mg/kg)、高 (20 mg/kg) 重铬酸钾溶液 (低、中、高剂量重铬酸钾组)。断乳后仔鼠灌胃与其母鼠相同剂量的重铬酸钾溶液, 共 6 个月。石墨炉原子吸收光谱法测定大鼠脑组织中铬含量; Morris 水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力; 尼氏染色和免疫组织化学等方法观察大鼠海马神经细胞及星形胶质细胞的形态学改变; 高效液相色谱法测定谷胱甘肽 (GSH) 含量。**结果** 低、中、高剂量重铬酸钾组脑组织中铬含量与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着染毒剂量增加, 大鼠平均逃避潜伏期和第一次寻找平台的潜伏期延长, 穿越原平台次数减少, 在原平台象限停留时间缩短 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 重铬酸钾组大鼠海马组织出现损伤、神经元排列紊乱及细胞核浓染固缩。星形胶质细胞 GFAP 阳性表达现象随剂量的增加而加重。与对照组比较, 铬暴露组大鼠海马组织的 GSH 含量下降 ($P < 0.05$)。**结论** 重铬酸钾可引起大鼠海马神经元结构及其功能损伤, 学习记忆能力降低, 其机制可能与 Cr(VI) 所诱导的氧化应激有关。

关键词: 六价铬; 学习记忆; 神经元; 星形胶质细胞; 谷胱甘肽

中图分类号: R995

文献标识码: A

Effect of chromium exposure on rats' learning and memory ability

Guo-xing Huang¹, Ling Gao¹, Dan-ting Zhao², Wen-qiang Yang², Xiao-lin Liu¹, Jing Yang²
(1. School of Public Health, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Liaoning
Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drugs, Jinzhou Medical University,
Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of chromium exposure on learning and memory in rat model.
Methods The rats were fed with distilled water (control group) or different concentrations of potassium bichromate solution (0.8, 4.0, 20.0 mg/kg) during lactation period. After weaning, the offspring rats were directly fed with the solutions the same as their mother rats for 6 months. The content of chromium in cerebral tissue were determined with the graphite furnace atomic absorption spectrophotometer. Learning and memory abilities of rats were tested by the Morris water maze experiment. The Nissl staining and immunohistochemical assay were performed to observe the morphological changes of the rat hippocampal nerve cells and astrocytes. High performance liquid chromatography was utilized to determine the content of glutathione (GSH). **Results** Chromium content in cerebral tissue of rats receiving various concentrations of potassium dichromate increased significantly compared with control group ($P < 0.05$). The time of passing through the platform and staying around the platform in potassium dichromate exposure group were prolonged compared with control group. With the increase of exposure dose, The average latency and latency to first entry were increased while number of animals crossing original platform and time of stay in the primary quadrant were decreased in dose dependent manner in exposure group when compared with those in control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, potassium bichromate induced hippocampus damage including

收稿日期: 2017-09-14

[通信作者] 柳晓琳, E-mail: 1186409306@qq.com; Tel: 15941628769

disordered neurons, and concentrated and contracted nucleus. Expression of GFAP in astrocytes increased while GSH content in hippocampus tissue decreased in exposure group in dose dependent manner when compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Exposure to chromium causes disfunction of hippocampal neurons, compromising learning and memory ability.

Keywords: hexavalent chromium; learning and memory; neuron; astrocyte; glutathione

铬是一种重金属元素, 主要以三价和六价的形式存在^[1], 其毒性与价态有关。在所有铬化合物中, 六价铬 [hexavalent chromium, Cr(VI)] 具有较大毒性 (免疫毒性、神经毒性、生殖毒性、遗传毒性及致癌性^[2])。环境铬污染和职业性接触铬化物中毒等事件使铬的危害受到人们广泛关注。流行病学和临床研究表明, 长期接触铬化合物的工人会出现头晕、头痛、失眠及记忆力减退等症状^[3-5]。重金属污染地区高铬暴露会对儿童的神经行为发育产生不良影响^[6], 铬中毒使婴儿出现惊厥、昏迷及瞳孔散大等中枢神经系统症状^[7], 说明铬具有神经毒性。

对 Cr(VI) 所诱导神经毒性研究中发现, Cr(VI) 可引起活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 升高和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 发生改变等一系列现象, 揭示 Cr(VI) 神经毒性可能与其氧化应激有关^[8]。铬所致神经系统损伤的研究较为少见, 机制尚不清楚。本研究通过灌服重铬酸钾对新生雄性大鼠进行染毒, 用水迷宫观察染毒对大鼠空间学习记忆的影响。通过观察大鼠海马神经细胞、胶质细胞的形态学变化及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量的变化, 探讨铬对大鼠学习记忆损伤机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AAAnalyst 800 原子吸收光谱仪 (北京普立泰科仪器有限公司), ST-600 全自动消解仪 (北京普立泰科仪器有限公司), AY120 电子分析天平 (日本岛津公司), ZH Morris 水迷宫程序自动控制仪 (中国科学院药物研究所研制), LC10Atvp 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$, 优级纯, 上海亭新化工试剂厂), 硝酸 (HNO_3 , 优级纯, 北京现代东方精细化学品有限公司), 高氯酸 ($HClO_4$, 优级纯, 上海金鹿化工有限公司), GFAP (GA-5): SC-58766 (美国盛克鲁斯生物技术有限公司), SP-9000 检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), ZLI-9018 二氨基联苯胺法 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 ($\times 20$) (北京中杉金桥生物技术有限公司) 等。

1.2 动物分组与给药

实验动物选择体重、健康状况相近无特定病原体级同一批次的 SD 怀孕大鼠 [锦州医科大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (辽) 2014-0004] 12 只进行实验。将 12 只孕鼠随机分为 4 组, 每组 3 只, 分别为对照组 (双蒸水)、重铬酸钾低 (0.8 mg/kg)、中 (4.0 mg/kg)、高 (20 mg/kg) 剂量组。待仔鼠出生后第 1 天起, 开始对孕鼠进行灌胃给药。灌胃剂量相同的孕鼠所生仔鼠为同一组, 哺乳期: 自出生第 1 天起通过母乳染毒; 断乳 (出生后 21 d) 后, 给予其与母鼠相同剂量的重铬酸钾灌胃给药, 1 次/d, 合计 6 个月。各组仔鼠中选择雄性大鼠进行实验, 对照组 11 只, 低、中、高剂量重铬酸钾组分别为 10、10、9 只。

1.3 实验方法

1.3.1 Morris 水迷宫行为学测试 $K_2Cr_2O_7$ 染毒结束前 1 周, 参照文献^[9]用 Morris 水迷宫实验来测试大鼠学习记忆能力: ①定位航行实验: 测试大鼠的学习能力, 每天将大鼠分别从 4 个入水点放入水中, 历时 6 d, 记录逃避潜伏期 (s); ②空间探索实验: 测定大鼠对原象限平台位置的记忆能力, 第 7 天撤去水下平台, 将大鼠从 4 个入水点面向池壁放入水中, 记录 120 s 内穿越原平台位置的次数以及在原平台象限停留时间和第 1 次穿越原平台位置的潜伏期。

1.3.2 脑组织铬含量测定 采用全自动湿法消解: 用电子天平称取大鼠脑组织 0.5 g 置于消解管内, 放置在消解架上。加入混酸 12 ml (硝酸: 高氯酸为 5: 1), 震荡加热, 待消解程序结束用超纯水定容至 50 ml, 同时做试剂空白。用石墨炉原子吸收光谱仪进行测定^[10]。

1.3.3 尼氏染色 水迷宫实验结束后, 麻醉处死动物, 迅速取出大鼠海马组织放入 10% 中性甲醛溶液中固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 进口石蜡包埋, 切片, 烤片, 脱蜡至水, 1% 甲苯胺蓝染色 56℃, 30 min, 分色脱水, 二甲苯浸泡, 中性树胶封片, 置于光学显微镜下观察其形态学变化。

1.3.4 GFAP 免疫组织化学染色 切片常规脱蜡至水, A 液 (柠檬酸) 18 ml+B 液 (柠檬酸钠) 82 ml+ 双蒸水 900 ml 于高压锅内进行抗原高压修复 2 min, 3%

过氧化氢孵育 15 min, 滴加一抗, 4℃过夜, 生物素化二抗工作液 (IgG/Bio), 置于恒温水浴箱中 37℃, 30 min, 辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP) 37℃, 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。阳性表达为棕黄色。

1.3.5 海马组织中 GSH 测定 称取海马组织, 加入 0.3 ml 衍生试剂 5,5'-二硫硝基苯甲酸 [5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 冰浴下超声粉碎, 1 200 r/min, 4℃, 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 倍体积乙醇, 静置过滤后上样, 吸取加入 DTNB 衍生试剂后的标准液和样品上清液, 混匀静置后进样。色谱条件: C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm × 5 μm), 流动相 A: 1% 甲酸, 流动相 B: 10% 四氢呋喃的乙腈溶液; B 相梯度洗脱条件为 0 min, 0% ~ 10%, 12 min, 10% ~ 14%, 22 min, 14% ~ 28%, 35 min, 28% ~ 80%, 40 min, 10%, 平衡 5 min, 25 min, 结束洗脱, 流速 0.8 ml/min, 荧光检测波长, 激发波长 λ_{ex}=254 nm, 发射波长 λ_{em}=327 nm, 柱温 38℃, 进样量 10 μl。通过峰面积, 采用外标法定量^[11], 含量以每克海马组织中 GSH 的含量 mg/g 表示。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用完全随机设计的方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑铬含量比较

各组大鼠脑组织铬含量比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 且随铬染毒剂量增加而升高。见表 1。

2.2 大鼠学习记忆行为比较

2.2.1 定位航行实验结果 各组大鼠在第 1、2、3、4、5 及 6 天的平均逃避潜伏期比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间的平均逃避潜伏期有

表 1 大鼠脑铬含量比较 (mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	脑铬含量
对照组 (<i>n</i> = 11)	5.5 ± 0.6
低剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 10)	7.4 ± 0.6 [†]
中剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 10)	8.5 ± 0.6 [†]
高剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 9)	9.4 ± 0.7 [†]
<i>F</i> 值	73.387
<i>P</i> 值	0.000

注: †与前一组比较, *P* < 0.05

差异 (*F* = 1546.992, *P* = 0.000); ②各组间的平均逃避潜伏期有差异 (*F* = 20.834, *P* = 0.000), 且随染毒剂量的增加而延长; ③各组的平均逃避潜伏期与时间的变化趋势有差异 (*F* = 6.318, *P* = 0.000)。见表 2。

2.2.2 空间搜索实验结果 各组大鼠第 1 次寻找原平台潜伏期、穿越原平台次数及在原平台所在象限的停留时间比较, 差异有统计学意义 (*F* = 93.510、28.513 和 32.397, 均 *P* = 0.000)。各组第 1 次寻找原平台潜伏期比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 且随染毒剂量的增加有所延长; 各组大鼠穿越原平台的次数以及在原平台所在象限的停留时间差异经两两比较有统计学意义 (*P* < 0.05), 且随着给药剂量的增加而减少。见表 3。

2.3 铬暴露对大鼠海马神经元的影响

对照组海马组织神经元排列有序、细胞数量丰富、细胞周围间隙不明显及神经细胞形态规则 (大多数呈锥形和球形, 结构清楚、胞浆透明、细胞核明显、呈圆形或椭圆形、核浆比值大及核仁清晰), 淡染呈浅蓝紫色、深染呈蓝紫色。重铬酸钾组神经元排列出现不同程度紊乱 (细胞数量减少、细胞间隙增宽、细胞形态不规则、部分细胞着色浅、胞体缩小、胞浆浓染、细胞核深染、固缩及形态不一)。见图 1。

2.4 铬暴露对大鼠海马组织 GFAP 蛋白表达的影响

在光镜下观察, 对照组大鼠海马区可见少量淡染

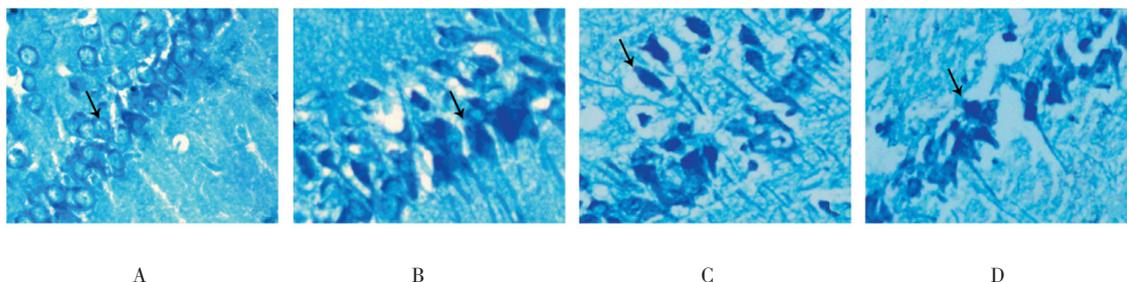
表 2 大鼠 Morris 水迷宫平均逃避潜伏期比较 (s, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
对照组 (<i>n</i> = 11)	35.3 ± 5.3	21.2 ± 2.5	18.0 ± 3.6	12.6 ± 2.7	11.4 ± 2.9	9.2 ± 1.9
低剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 10)	41.4 ± 6.1	26.3 ± 4.8	23.4 ± 3.9	17.3 ± 3.6	14.8 ± 3.5	12.2 ± 2.3
中剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 10)	47.1 ± 6.4	31.7 ± 4.7	28.5 ± 5.3	22.1 ± 4.4	18.0 ± 3.2	15.1 ± 3.5
高剂量重铬酸钾组 (<i>n</i> = 9)	53.0 ± 6.8	36.5 ± 6.0	33.5 ± 5.5	26.6 ± 5.1	22.9 ± 4.3	17.9 ± 3.9

的星形胶质细胞, 胞体较小且突起较短。重铬酸钾组大鼠海马区可见大量棕黄色星形胶质细胞, 且星形胶质细胞密度和染色深度均较对照组偏高, 胞体较大且突起较粗, 阳性表达细胞较多。见图 2。

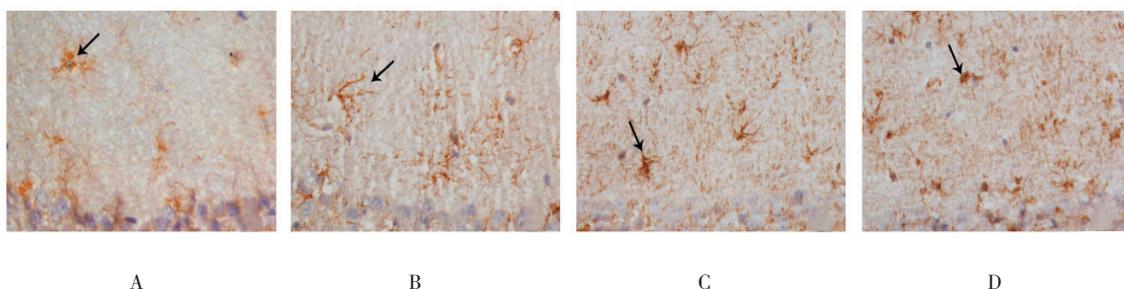
2.5 大鼠海马组织 GSH 含量比较

各组大鼠海马组织 GSH 含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着染毒剂量增高, GSH 含量降低。见表 4。



A: 对照组; B 低剂量重铬酸钾组; C: 中剂量重铬酸钾组; D: 高剂量重铬酸钾组。箭头示为神经元

图 1 不同剂量的铬暴露对大鼠海马神经元的影响 (尼氏染色 × 400)



A: 对照组; B 低剂量重铬酸钾组; C: 中剂量重铬酸钾组; D: 高剂量重铬酸钾组。箭头示为阳性表达的星形胶质细胞

图 2 不同剂量的铬暴露对大鼠海马组织 GFAP 蛋白表达影响 (免疫组织化学 × 400)

表 3 大鼠 Morris 水迷宫空间搜索实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 次寻找原平台潜伏期 /s	穿越原平台次数 / 次	在原平台象限停留时间 /s
对照组 (n=11)	5.6 ± 0.8	11.1 ± 2.1	46.0 ± 7.9
低剂量重铬酸钾组 (n=10)	8.5 ± 1.3	8.3 ± 1.9	33.7 ± 7.2
中剂量重铬酸钾组 (n=10)	12.1 ± 1.6	6.3 ± 1.7	24.5 ± 6.5
高剂量重铬酸钾组 (n=9)	16.0 ± 1.9	4.2 ± 1.1	17.8 ± 5.3
F 值	93.510	28.513	32.397
P 值	0.000	0.000	0.000

表 4 大鼠海马组织 GSH 含量比较 ($\mu\text{mol/mg}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	GSH
对照组 (n=11)	1.2 ± 0.1
低剂量重铬酸钾组 (n=10)	0.8 ± 0.1
中剂量重铬酸钾组 (n=10)	0.5 ± 0.0
高剂量重铬酸钾组 (n=9)	0.3 ± 0.0
F 值	123.41
P 值	0.000

3 讨论

铬存在多种价态, 其中 Cr(VI) 具有生物氧化毒性。在自然界主要以铬酸盐或重铬酸盐的形式存在, 毒性最强^[12]。神经系统由于其特殊性, 是重金属毒性的靶点, 更容易受到重金属离子的影响而引起损伤。目前关于铬的研究大多都集中对肝脏、肾脏及肺脏等

多种器官的毒性作用, 对 Cr(VI) 神经毒性的认识甚少。本研究经 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的 6 个月染毒, 发现大鼠有活动量和食量逐渐减少、躁动不安及反应迟钝等一系列改变, 提示铬对大鼠神经系统有一定的毒性作用, 与文献报道基本一致^[13]。

Morris 水迷宫由英国心理学家 MORRIS 于 20 世纪 80 年代初设计, 其应用与海马功能直接相关的空间学习记忆脑机制研究, 能准确地反映动物空间学习和记忆能力, 广泛应用于学习记忆的神经生物学和神经

药理研究。Morris 水迷宫实验结果表明,随着铬剂量增加,重铬酸钾组大鼠的学习记忆能力也逐渐降低,表明铬对大鼠的学习记忆能力影响存在一定剂量的效应关系,提示铬染毒影响大鼠的空间学习记忆能力。原子吸收脑铬含量的测定进一步表明,随着重铬酸钾剂量增加,脑铬含量也随之升高。

尼氏染色结果显示,重铬酸钾给药组神经元排列出现不同程度的紊乱,说明 Cr(VI)暴露对大鼠的海马神经细胞造成损害。免疫组织化学法实验选择星形胶质细胞标志性蛋白 GFAP^[14-15],探讨 Cr(VI)所致 SD 大鼠神经系统影响。结果发现,对照组大鼠的海马区仅可观察到少量淡染的星形胶质细胞,胞体较小并且突起较短;重铬酸钾组则可见大量棕黄色的星形胶质细胞,胞体较大且突起较粗,阳性细胞数比正常组多,且剂量越大,阳性表达现象越明显,提示 Cr(VI)暴露会对大鼠海马星形胶质细胞有活化作用,剂量越大,活化越明显。

GSH 是人体内一种主要生物活性成分,由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸残基组成。在体内起活化代谢还原系统、激活 SH 酶及解毒等作用^[14],并参与体内的多种代谢反应。Cr(VI)进入细胞后,诱导机体产生自由基,中间产物和自由基均可对 DNA、蛋白及脂质等产生损伤,主要在细胞内 GSH 和抗坏血酸等还原剂的作用下被清除^[16-17]。随着重铬酸钾剂量增大,大鼠海马组织中 GSH 含量有不同程度的降低,提示 Cr(VI)会对海马组织造成损伤,其原因可能是随着 Cr(VI)染毒剂量增加产生的 ROS 也随之增加^[18],从而导致细胞内抗氧化系统 GSH 消耗增加^[19-20],而使 GSH 含量降低。

综上所述,长期 Cr(VI)暴露,将对大鼠海马组织造成损伤,导致其学习记忆能力的改变,最后引起大鼠空间学习记忆能力下降。笔者将对 Cr(VI)的神经毒性进行更深入研究。

参 考 文 献:

- [1] 张云江,何杨,张瑶瑶,等.辽宁省一般人群全血和尿液中铬水平分析[J].中国公共卫生杂志,2016,32(5):639-642.
- [2] 考庆君,吴坤,邓晶,等.三价铬和六价铬对大鼠长期慢性毒性的比较[J].癌变·畸变·突变,2007,19(6):474-478.
- [3] 曹信金,谢德兴.某电镀厂铬作业危害调查[J].职业与健康,2005,21(7):992-993.
- [4] 李敏,张丽华,黄丽蓉,等.职业接触酸雾工人健康状况调查[J].中国职业医学,2012,39(2):175-176.
- [5] 王彦,耿盈,周宇红,等.铬中毒人体脏器损伤探讨[J].中国卫生标准管理,2014,5(6):52-53.
- [6] 刘伟,杨辉,廖伟棠,等.电子垃圾拆解区儿童血铬水平与行为问题关系的研究[J].汕头大学医学院学报,2011,24(1):26-29.
- [7] 吴茂江.铬与人体健康[J].微量元素与健康研究,2014,31(4):72-73.
- [8] DASHTI A, SOODI M, AMANI N. Cr(VI) induced oxidative stress and toxicity in cultured cerebellar granule neurons at different stages of development and protective effect of Rosmarinic acid[J]. Environ Toxicol, 2016, 31(3): 269-277.
- [9] MORRIS R. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47-60.
- [10] 易海艳,高寿泉.曲拉通 X-100 稀释样品石墨炉原子吸收光谱法测定血铬[J].中国职业医学,2012,39(4):340-341.
- [11] WEI CHEN, YONG ZHAO, TERESA SEEFELDT, et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(5): 1375-1380.
- [12] BANO F, ZUTSHI S, FATMA T. Chromium(VI) induced oxidative stress in Hapalosiphon fontinalis[J]. World Microbiol Biotechnol, 2012, 28(7): 2505-2511.
- [13] WORMLEY D D, RAMESH A, HOOD D B. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 197(1): 49-65.
- [14] 曲卓慧,孟春,王耀辉.奥沙利铂神经毒性的机制及防治方法[J].中国全科医学,2008,11(2):139-141.
- [15] DINGY S. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(23): 2048-2052.
- [16] SOUDANI N, RAFRAFI M, BEN I, et al. Oxidative stress-related lung dysfunction by chromium(VI): alleviation by Citrus aurantium L[J]. Journal of Physiology and Biochemistry, 2013, 69(2): 239-253.
- [17] KE JIAN LIU, XIANGLIN SHI. In vivo reduction of chromium(VI) and its related free radical generation[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001, 222(1/2): 41-47.
- [18] NINO ASATIANI, NELLY SAPOJNİKOWA, MARINA ABULADZE, et al. Effects of Cr(VI) long-term and low-dose action on mammalian antioxidant enzymes (an in vitro study)[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004, 98(3): 490-496.

(王荣兵 编辑)